

UNIVERSITE DE SHERBROOKE

SYNTHESE ET DEVELOPPEMENT D'ANALOGUES PEPTIDIQUES PHOTO-
ACTIVABLES SELECTIFS AU RECEPTEUR V_1 OU V_2 DE LA VASOPRESSINE
ET LE DEVELOPPEMENT D'ANTICORPS SELECTIFS ANTI- V_1 ET ANTI- V_2

par

Richard Bouley

Département de Pharmacologie

Mémoire présenté à la faculté de médecine

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M. Sc.)

décembre 1993



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services Branch

395 Wellington Street
Ottawa, Ontario
K1A 0N4

Bibliothèque nationale
du Canada

Direction des acquisitions et
des services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa (Ontario)
K1A 0N4

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted an irrevocable non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of his/her thesis by any means and in any form or format, making this thesis available to interested persons.

L'auteur a accordé une licence irrévocable et non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de sa thèse de quelque manière et sous quelque forme que ce soit pour mettre des exemplaires de cette thèse à la disposition des personnes intéressées.

The author retains ownership of the copyright in his/her thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without his/her permission.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège sa thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

ISBN 0-315-93149-3

Canada

décembre 1993

RESUME

SYNTHÈSE ET DEVELOPPEMENT D'ANALOGUES PEPTIDIQUES PHOTO-ACTIVABLES SELECTIF AU RECEPTEUR V₁ OU V₂ DE LA VASOPRESSINE ET DEVELOPPEMENT D'ANTICORPS DIRIGES CONTRE DES FRAGMENTS SPECIFIQUES DE V₁ ET V₂

par

Richard Bouley

Département de Pharmacologie

mémoire présenté à la faculté de médecine de l'université de Sherbrooke en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)

Les récepteurs de la vasopressine (VP) ont jusqu'à tout récemment résisté aux efforts multiples d'isolements et de clonages. Un obstacle premier était l'absence de marqueurs sélectifs qui permettent un marquage efficace au préalable à l'isolation de la protéine réceptrice. Nous avons mené une étude de structure-activité d'analogues peptidiques de la vasopressine pour identifier des molécules qui sont à la fois dotées: d'un résidu photo-activable à hauts rendements, d'un résidu pour l'incorporation de l'¹²⁵I, d'une haute affinité et d'une plus grande sélectivité entre V₁ et V₂. Parmi ces peptides, nous avons identifié deux analogues prometteurs. Le premier, [β,β diméthyl-β-mercaptopropionyl¹, p-benzoylphenylalanyl², Val⁴, His⁸, D-tyr⁹]VP qui a un excellent pKd de 9.6 sur V₁ (foie de rat) et un pKd de 6.1 sur V₂ (rein de rat). La sélectivité pour le V₁ est donc plus qu'un facteur 3000. Le photomarqueur est en position 2 et le site d'iodation est en position 9. Le deuxième peptide, le [β,β-cyclopenta-méthylène-β-mercaptopropionyl¹, D-p-benzoylphenylalanyl², nitrophényl³, Ile⁴, desGly⁹]VP démontre un pKd sur V₂ de 8.7 et sur V₁ de 6.65, donc une sélectivité de 100 fois pour le V₂. Le site de radio-marquage est situé en position 3 et se fait par la méthode de Gatterman-Sandmeyer. Le premier analogue a permis d'identifier par photomarquage une protéine de masse moléculaire de 53 kDa et de 43 kDa, après déglycosylation, la masse identifiée correspond au 44.2 kDa déduit de la séquence du récepteur V₁. Nos études effectuées avec des photo-marqueurs sélectifs pour les récepteurs de type V₁ et V₂ de la vasopressine ont été élargies grâce à l'utilisation d'anticorps à haute spécificité pour les récepteurs déjà clônés. Ces anticorps polyclonaux ont été produits par immunisation avec des nonapeptides correspondant à des fragments spécifiques de V₁ ou de V₂. Les fragments correspondant à des boucles extracellulaires du V₁ et du V₂ ont été synthétisés: V₁ (194 à 203): V-N-N-G-T-K-T-Q-D-NH₂, V₁ (324 à 332): N-F-I-W-T-D-S-E-N-NH₂ et V₂ (183 à 191): V-G-N-G-S-G-V-F-D-NH₂, V₂ (297 à 305): P-E-A-P-L-E-R-P-P-NH₂. Une immunisation ont été faite avec un mixotope représentant une séquence commune au V₁, au V₂ et au récepteur de l'oxytocine: V₁ (208 à 218)\V₂ (193 à 205)\ OTR (193 à 205): F-I-Q-P-W-G-(T\PL)-R-A-Y-NH₂. Celle-ci constitue un témoin non-discriminatif qui pourrait permettre éventuellement de déceler d'autres récepteurs de VP qui ne sont pas encore clônés. Les antigènes d'immunisation ont été produits en ajoutant un ³H-Lys additionnel en N-terminal. Les affinités se situaient entre 10 et 10 000 pM pour l'antigène de détection couplé à l'ovalbumine et une absence de réaction croisée indique une haute spécificité. Le buvardage de préparations membranaires hépatiques et rénales de rat confirme que les anticorps reconnaissent sélectivement leurs récepteurs respectifs. Des études d'immunofluorescence et de buvardage sur des cellules rénales humaines permettent de constater que les anticorps se lient sur les récepteurs humains sous leurs formes natives ou dénaturées.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIERES	ii
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX	ix
ABREVIATION	x
RESUME	xii
INTRODUCTION	1
Historique	2
Etudes de caractérisations biochimiques	7
Notre étude	10
MATERIEL ET METHODES	15
1 SYNTHÈSE PEPTIDIQUE	16
1.1 Synthèse peptidique des analogues d'AVP et des séquences antigéniques	16
1.2 Cyclisation des analogues peptidiques d'AVP	22
1.3 Purification des peptides	22
1.4 Caractérisation des peptides	23
2 PREPARATIONS MEMBRANAIRES	24
2.1 Préparations des membranes de foie de rat	24
2.2 Préparation des membranes de rein de rat	25

3 ETUDE DE LIAISON DES ANALOGUES PEPTIDIQUES D'AVP	26
3.1 Courbes dose-déplacement du ^3H -AVP par des doses croissantes d'analogues d'AVP	26
4 IODATION DES ANALOGUES DE LA VASOPRESSINE	28
4.1 Iodation de peptide par la technique à l'Iodo-gen	28
4.2 Iodation d'un peptide par la méthode de Gatterman-Sandmeyer	29
5 PHOTOMARQUAGE DU RECEPTEUR V_1 PAR UN ANALOGUE SELECTIF	32
6 ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE (SDS-PAGE)	33
6.1 Préparation des échantillons d'electrophorèse	33
6.1.1 Préparation des protéines membranaires de foie glycosylées	33
6.1.2 Préparation des protéines membranaires de foie déglycosylées	33
6.2 Migration sur gel SDS-PAGE 3-12%	34
6.3 Mise en évidence des bandes	35
6.3.1 Coloration au bleu de Coomassie	35

7 ANTIGÈNES ET ANTICORPS	37
7.1 Couplage des peptides aux protéines porteuses	39
7.1.1 Couplage des peptides sur le KLH à l'aide du DSS	39
7.1.2 Couplage des peptides à l'ovalbumine à l'aide de la glutaraldéhyde.	39
7.2 Dialyse	39
8 IMMUNISATION	40
8.1 Préparation du sérum	41
9 ESSAI ELISA	41
9.1 Etape de liaison de l'antigène à la plaque	41
9.2 Saturation des sites non-spécifiques sur les parois des puits	42
9.3 Addition du sérum de lapin	42
9.4 Addition de l'anti-anticorps	43
9.5 Développement de la coloration	43
10 BUVARDAGE DE PROTEINES	44
11 IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE	46
RESULTATS	48
1 DETERMINATION DE L'AFFINITE ET DE LA SELECTIVITE DES ANALOGUES PHOTOACTIVABLES	49
2 IODATION DES ANALOGUES PEPTIDIQUES PHOTO-ACTIVABLES	58

LISTE DES FIGURES

Fig 1	Courbe étalon pour le dosage de protéines	26
Fig 2	Mécanisme simplifié de l'iodation par la réaction de Gatterman/Sandmeyer	30
Fig 3	Calibration d'un gel d'électrophorèse 3-12%	37
Fig 4	Courbes dose-déplacement de ^3H -AVP avec des analogues contenant un nitrophénylalanine ou un azidophénylalanine	52
Fig 5	Courbes dose-déplacement de ^3H -AVP avec des analogues de d'AVP contenant le p-Benzoylphenylalanine	54
Fig 6	Courbes dose-déplacement de ^3H -AVP avec les analogues sélectifs: le EE683 et le EE693	56
Fig 7	Profil d'élution sur colonne C-18 d'HPLC des analogues ^{125}I -EE539 et ^{125}I -EE683	59
Fig 8	Profil d'élution sur colonne C-18 d'HPLC des analogues ^{125}I -EE693	60

Fig 9	Courbes dose-déplacement de ^3H -AVP, ^{125}I -EE539 et ^{125}I -EE683 sur une préparation membranaire de foie	65
Fig 10	Représentation de Scatchard des courbes de saturation des sites V_1 sur une préparation membranaire hépatique par ^3H -AVP et ^{125}I -EE539 et ^{125}I -EE683	66
Fig 11	Courbes dose-déplacement de ^3H -AVP, ^{125}I -EE693 par l'AVP sur une préparation membranaire de rein	67
Fig 12	Représentation de Scatchard des courbes de saturation des sites V_2 sur une préparation membranaire rénale par ^3H -AVP et ^{125}I -EE693	68
Fig 13	Courbes dose-déplacement de ^3H -AVP, ^{125}I -EE539 ^{125}I -EE683 sur une préparation membranaire de plaquettes purifiées ou non-purifiées	70
Fig 14	Représentation de Scatchard des courbes de saturation des sites V_1 sur une préparation membranaire de plaquettes purifiées ou non-purifiées par ^3H -AVP, ^{125}I -EE683 et ^{125}I -EE539	72
Fig 15	Migration sur SDS-PAGE 3-12% des protéines hépatiques photomarkées en présence de ^{125}I -EE539	77
Fig 16	Migration sur SDS-PAGE 3-12% des protéines hépatiques photomarkées en présence de ^{125}I -EE683	79
Fig 17	Migration sur SDS-PAGE 3-12% des protéines provenant des membranes plaquettaires purifiées photomarkées en présence de ^{125}I -EE539 ou ^{125}I -EE683	

Fig 18 Migration sur SDS-PAGE 3-12% des protéines membranaires provenant des membranes plaquettaires non-purifiées de photomarquées en présence de ^{125}I -EE683	82
Fig 19 Autoradiographie après une migration sur SDS-PAGE 3-12% des protéines hépatiques photomarquées en présence de ^{125}I -EE683	83
Fig 20 Immunodétection des récepteurs d'AVP sur des préparations hépatiques et rénales de rat	90
Fig 21 Immunodétection des récepteurs déglycosilés d'AVP sur des préparations hépatiques de rat	91
Fig 22 Etude d'immunofluorescence sur des lignée cellulaires de muscles lisses d'aorte thoracique de rat foétal (A_7R_5) à l'aide d'anticorps sélectifs envers les récepteurs d'AVP	95
Fig 23 Etude d'immunoflorescence sur des lignées cellulaires d'épithélium du tubule proximal rénal humain (PT_1) à l'aide d'anticorps sélectifs envers les récepteurs d'AVP	97
Fig 24 Caractérisation de la masse moléculaire des récepteurs d'AVP des cellules PT_1 par immunodétection	98

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Séquences en acides aminés ou structure primaire des peptides de la superfamille Vasopressine/Oxytocine	3
Tableau II	Structure et propriétés physico-chimiques des analogues photosensibles d'AVP	12
Tableau III	Programme de la synthèse semi-automatique des peptides en phase solide	19
Tableau IV	Liste des réactifs et solvants utilisés pour la synthèse peptidique	20
Tableau V	Liste des acides aminés et leurs dérivés utilisés pour la synthèse peptidique	21
Tableau VI	Affinité et sélectivité des analogues d'AVP	57
Tableau VII	Affinité des analogues photosensibles radio-iodés d'AVP	62
Tableau VIII	Analyse d'acides aminés obtenus après hydrolyse acide des peptides servant à l'immunisation	85

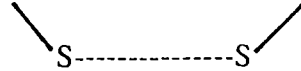
ABREVIATIONS

A.A	acide aminé
AC-x	anticorps polyclônaux contre la séquence x
AG-x	antigène numéro x
A ₇ R ₅	lignée cellulaire de muscle lisse d'aorte thoracique foétale de rat
AVP	argine-vasopressine
³ H-AVP	argine-vasopressine tritiée
BOC	tert-butyloxycarbonyl
Bpa	p-benzoyl phénylalanine
BSA	albumine sérique de boeuf
CPA	acide β,β -cyclopentaméthylène- β -mercaptopropionyle
DEPA	acide β,β -diéthyle- β -mercaptopropionyle
DMPA	acide β,β -diméthyle- β -Mercaptopropionyle
DSS	disuccinimidyle subérate
EExxx	numéro de référence du peptide
¹²⁵ I-EExxx	numéro de référence du peptide iodé
ELISA	"enzyme-linked-immunoabsorbent-assay"
KLH	"keyhole limpet hémocyanine"
MPA	acide β - β -mercaptopropionyle
OTR	récepteur de l'oxytocine
PBS	tampon sodium phosphate

PCK	protéine kinase C
PT ₁	lignée cellulaire de l'épithélium du tubule proximal rénal humain
SDS-PAGE	electrophorèse sur gel de polyacrylamide (sodium dodecyl sulfate)
SIADH	sécrétion inapproprié d'hormone anti-diurétique
TFA	acide trifluoro acétique
VP	vasopressine
V ₁	récepteur de la vasopressine de classe 1
V ₂	récepteur de la vasopressine de classe 2
V _p	récepteur de la vasopressine au niveau du rein
V _{1b}	récepteur de la vasopressine de classe 1
V _{1a}	récepteur de la vasopressine de classe 1

INTRODUCTION

L'arginine-vasopressine ou AVP est une hormone neuro-peptidique cyclique de 9 acides aminés ayant la séquence H-Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH₂. L'AVP fait



partie de la grande famille de la vasopressine (VP)\ oxytocine (OT) (Tableau I). Cette famille regroupe les peptides qui ont un ancêtre commun vieux de 400 millions d'années (VAN KESTEREN et al., 1992) et qui ne diffèrent de l'AVP que par quelques acides aminés. Les membres de cette famille se retrouvent dans plusieurs échelons de l'évolution animale. On a retrouvé au niveau des invertébrés, comme les conus, deux différentes sortes de VP soit: Lys et l'Arg-conopressines. Chez les vertébrés non-mammifères, on retrouve la vasotocine. Chez les mammifères à l'exception des rats Brattleboro, on dénombre trois types de VP soit: la Phénypressine, la Lys-VP et l'AVP (CRUZ et al., 1987). Les rats Brattleboro sont une exception, ils ont un gène d'VP homozygote et ils n'expriment donc pas d'VP (KIM et al., 1990). Notre étude portera exclusivement sur les récepteurs de l'AVP.

HISTORIQUE

La synthèse de l'AVP est fait principalement dans les cellules des noyaux supraoptiques et paraventriculaires de l'hypothalamus ainsi qu'au niveau des vaisseaux sanguins (SIMON et al., 1990). Le gène d'AVP qui est composé de deux introns et de 3 exons est co-localisé sur le même gène de l'oxytocine. Tout deux sont séparés par une longueur intergénique variable de 3.5 à 11 kb selon l'espèce et ils ont une orientation transcriptionnelle opposée. Chez l'humain, le gène d'AVP se localise sur le chromosome

Tableau I Séquences en acides aminés ou structures primaires des peptides de la superfamille vasopressine/oxytocine

Cys	Phe	Ile	Arg	Asn	Cys	Pro	Lys	Gly-NH ₂	Lys-conopressine	Conus stagnalis
Cys	Ile	Ile	Arg	Asn	Cys	Pro	Arg	Gly-NH ₂	Arg-conopressine	Conus striatus
Cys	Leu	Ile	Thr	Asn	Cys	Pro	Arg	Gly-NH ₂	hormone diurétique	Locusta migratoria
Cys	Tyr	Ile	Gln	Asn	Cys	Pro	Arg	Gly-NH ₂	vasotocine	vertébré nonmammifère
Cys	Tyr	Phe	Gln	Asn	Cys	Pro	Arg	Gly-NH ₂	Arg-vasopressine	mammifère
Cys	Tyr	Phe	Gln	Asn	Cys	Pro	Lys	Gly-NH ₂	Lys-vasopressine	mammifère
Cys	Tyr	Phe	Gln	Asn	Cys	Pro	Phe	Gly-NH ₂	phénypressine	mammifère
Cys	Tyr	Phe	Arg	Asn	Cys	Pro	Ile	Gly-NH ₂	Céphalotocine	Octopus vulgaris
Cys	Tyr	Ile	Asn	Asn	Cys	Pro	Leu	Gly-NH ₂	Aspargtocine	poisson cartilagineux
Cys	Tyr	Ile	Gln	Asn	Cys	Pro	Val	Gly-NH ₂	Valitocine	poisson cartilagineux
Cys	Tyr	Ile	Ser	Asn	Cys	Pro	Gln	Gly-NH ₂	Glumitocine	poisson cartilagineux
Cys	Tyr	Ile	Ser	Asn	Cys	Pro	Ile	Gly-NH ₂	Isotocine	poisson non cartilagineux
Cys	Tyr	Ile	Gln	Asn	Cys	Pro	Ile	Gly-NH ₂	Mesotocine	Mammifère, reptile, oiseau
Cys	Tyr	Ile	Gln	Asn	Cys	Pro	Leu	Gly-NH ₂	Oxytocine	mammifère
1	2	3	4	5	6	7	8	9		

20 tandis que le gène du récepteur se situe sur la 23^{ème} paires (GAINER et WRAY, 1992). L'AVP, après transcription et traduction du gène est accumulée au niveau de l'hypophyse. La libération de l'AVP de l'hypophyse postérieure est soumise à une régulation complexe. Certaines hormones peptidiques telles l'adrénocorticotropine, l'angiotensine II, le neuropeptide Y et la cholecystokinine tout comme certains neurotransmetteurs (glutamine, asparagine et norepinephrine) ont un effet positif sur la libération de l'AVP. L'estrogène (hormone stéroïdienne) possède aussi un effet positif sur la sécrétion de l'AVP. La libération d'AVP est inhibée sous l'effet d'opioïdes et de neurotransmetteurs tels la dopamine et l'acide gamma-aminobutyrique (GRIFFIN et OJEDA, 1992). L'AVP, lorsqu'elle est sécrétée, peut se lier sur plusieurs types de récepteurs soit: V_2 (rein), V_{1b} (hypophyse) ou V_1 (foie, vésicule séminale, plaquettes, "midbrain", noyau septal, thalamus, testicule, prostate, vaisseaux sanguins, ovaires, glandes surrénales, corpus lutéum, thymus, (LOUP et al., 1991, TAHRI-JOUTEI et al., 1991, SIMON et al., 1991). La liaison de l'AVP à ces récepteurs mène à plusieurs effets physiologiques; l'effet le plus important de tous est la capacité via le V_2 de maximiser la réabsorption d'eau au niveau des tubules contournés distaux et collecteurs du néphron (THIBONNIER et al., 1987). Dû à cette fonction, l'AVP est aussi appelée hormone anti-diurétique (ADH), elle se lie aux récepteurs V_2 rénaux et ainsi participe d'une façon active à la régulation fine de l'osmolarité et du volume sanguin. La liaison d'AVP sur V_1 entraîne une seconde action bien connue, c'est sa capacité de vasoconstriction, d'où l'origine du nom trivial de "vasopressine". L'AVP est un des plus puissants agents vasoconstricteurs après l'endothéline in vitro, possédant une affinité comparable et même supérieure à celle de l'angiotensine II pour son récepteur (YANAGISAWA et MASAKI, 1989, ALTURA et ALTURA, 1977). Un rôle hypothétique dans l'hypertension lui a été attribué par Corwleyn

(1981) qui a démontré une corrélation positive entre la concentration plasmatique d'AVP et l'hypertension. Cette hypothèse est affaiblie par l'inefficacité des antagonistes d'AVP dans le traitement de l'hypertension essentielle (SAWYER et MANNING, 1988). L'AVP (ou ADH) a plusieurs rôles moins étudiés tels que l'activité mitotique, la régulation de l'aldostérone (GUILLON et al., 1990), son rôle dans l'augmentation de la mémoire (WEINGARTNER et al., 1981) et son contrôle sur la soif (JENKINS et al., 1991).

Une étude récente a démontré l'importance de l'AVP sur les fonctions cognitives, la mémoire et l'apprentissage. Selon cette étude, une injection d'AVP améliore le contrôle des gestes sur les personnes du troisième âge. L'AVP a aussi servi dans le traitement de la schizophrénie où une augmentation de la concentration de l'AVP chez la personne semble atténuer les symptômes (CARTER et al., 1991). L'AVP aide à la prolifération des fibroblastes (THIBONNIER et al., 1988) et à la coagulation par sa liaison sur les plaquettes sanguines (THIBONNIER et al., 1990). D'autres études ont démontré qu'un agoniste d'AVP aurait des valeurs cliniques chez des patients souffrant d'hémophilie A et ceux atteints par la maladie de Von-Willebrand (hémophilie vasculaire). L'AVP stimule la relâche du facteur de coagulation de Von Willebrand et le facteur VIIIc dans l'humain (KINTER et al., 1992) tandis que des études proposent un mécanisme où l'antagoniste diminue la production de l'acide 13-hydroxyoctadécadiénoïque (SETTY et al., 1992).

L'AVP amène une réorganisation du cytosquelette par une dépolarisation de la fibre F-actine par une accumulation d'AMPc (HOLMGREN et al., 1992). Certains antagonistes d'AVP ont servi avec succès dans le traitement du syndrome de Scharz-Barther où il y a une

sécrétion inappropriée d'AVP. De plus, l'AVP possède une activité glycogénolytique au niveau de l'hépatocyte de rat (DEWULF et al., 1980), stimule la relâche d'adrénocorticotropine par les cellules corticotrophes de l'adénohypophyse chez le rat et l'humain et induit une mitogénèse et une stéroïdogénèse au niveau des cellules de la zona glomerulosa de la surrénale (PAYET et LEHOUX, 1982, GALLO-PAYET et al., 1984). Grâce au clonage des récepteurs V_2 humains (BIRNBAUMER et al. (1992)), on a pu démontrer qu'un défaut dans le récepteur V_2 au niveau de la troisième boucle était responsable du diabète néphrogénique insipidus congénital (LOLAIT et al. 1992).

Tous les effets physiologiques que nous avons décrits sont dûs à la liaison de l'AVP à ses récepteurs. La distinction entre les différents types de récepteurs s'effectue principalement à l'aide de l'identité du second messenger libéré après la liaison de l'AVP sur le récepteur (MICHELL et al., 1979). Au niveau du rein, lors de stimulation du récepteur soit le V_2 , la concentration d'AMPC augmente. Ainsi le V_2 est associé à l'adénylate cyclase par une protéine- G_q . Le V_2 , par un mécanisme associé à l'accumulation d'AMPC, semble responsable de l'augmentation de la perméabilité membranaire permettant la réabsorption de l'eau à partir de la lumière du tubule collecteur (JARD et al., 1988). Au niveau du foie, on retrouve essentiellement le récepteur de classe V_1 , qui active une phospholipase C. Cette enzyme hydrolyse le phosphatidylinositol bisphosphate en deux produits: l'inositol 1,4,5-trisphosphate (IP_3) et le diacylglycérol (DAG). L' IP_3 fait augmenter la concentration des ions calciques dans le cytoplasme, ce qui active les protéines kinases calmodulines dépendantes. Le DAG active une kinase membranaire (protéine kinase C (PKC)). Ces différentes kinases amènent donc à la phosphorylation de différents substrats conduisant à différentes réponses biologiques. Des

analogues peptidiques nouvellement synthétisés ont permis de différencier deux sous-classes de V_1 soit le V_{1a} qui se retrouve dans le foie et le système sanguin et le V_{1b} qui se situe au niveau de l'hypophyse antérieure (JARD et al., 1986).

L'impossibilité d'inhiber l'augmentation AVP dépendante du calcium libre par des antagonistes sélectifs à V_1 et V_2 suggère la présence d'un nouveau récepteur dans le tubule proximal soit V_p (JUNG et ENDOU, 1991). Malgré que l'on avait réussi à synthétiser entièrement l'hormone depuis des dizaines d'années (DU VIGNEAUD, 1956) personne ne pouvait prétendre avoir élucidé la structure du récepteur jusqu'à récemment. Le clonage des récepteurs V_1 et V_2 en 1992 a confirmé l'hypothèse que les récepteurs sont des protéines à sept domaines trans-membranaires couplés à des protéines G_q . Le V_{1a} de rat contient 394 acides aminés (A.A.) et a une masse moléculaire de 44 kDa (MOREL et al., 1992). Le récepteur V_2 de rat possède une séquence de 371 A.A formant sept domaines trans-membranaires. Sa masse protéique est estimée à 40 kDa (BIRNBAUMER et al., 1992). Le clonage du V_{1b} et du V_p n'a pas été effectué. On pense qu'ils y a une grande similarité de structure entre les récepteurs d'un même type malgré qu'ils soient d'espèces différentes. Le récepteur V_2 humain a été cloné par BIRNBAUMER (1992), les similitudes entre le récepteur V_2 humain et le V_2 de rat, le V_1 de rat et le récepteur de l'oxytocine humaine sont de 87%, 48%, 49% respectivement (BARBERIS et al., 1993).

ETUDES DE CARACTERISATIONS BIOCHIMIQUES

Lors de notre étude, une technique utilisée fut l'attachement covalent d'AVP tritié (3H -

AVP) aux récepteurs à l'aide de réactifs bi-fonctionnels. Cette technique de réticulation a permis d'évaluer des masses de 60 kDa pour le V_1 de foie de rat (ESTRADA et al., 1991) et de 50 kDa pour la masse du V_2 du rein de cochon (AIYAR et al., 1989). Une autre technique utilisée pour la caractérisation du récepteur est le photomarquage. Cela consiste à créer un lien covalent entre le récepteur et l'analogue à l'aide de rayons ultra-violet. Les analogues d'AVP utilisés dans ce type d'étude doivent contenir un groupement photoactivable qui devient réactif sous l'influence d'une source d'ultra-violet. Le groupement chimique peut réagir avec d'autres groupements avoisinants (C-H entre autres) pour former un lien covalent entre l'hormone et le récepteur (HAZUM, 1983).

Les résultats obtenus par photomarquage ont l'avantage d'être beaucoup plus spécifiques et reproductibles que les résultats obtenus par réticulation du récepteur par un réactif bi-fonctionnel (BARBEAU et al., 1991). Un autre avantage d'un groupement photoactivable est sa structure peu encombrante permettant d'être introduits facilement comme acide aminé dans une structure peptidique lors de la synthèse de l'analogue. Les premières expériences de photomarquages ont été faites avec un analogue tritié ([MPA¹, Lys (N-4-azidobenzoyl)]⁸]VP, contenant un groupement photoactivable (4-azidobenzoyl) sur la lysine. Les résultats suggèrent que le récepteur hépatique de rat (V_1) est composé de deux sous-unités ayant une masse de 30 et une de 38 kDa (BOER et FAHRENHOLZ, 1985). L'utilisation de ce même photomarqueur tritié [MPA¹, Lys (N-4-azidobenzoyl)]⁸]VP a permis d'évaluer une masse de 30 kDa pour le récepteur rénal V_2 de rat (FAHRENHOLZ et al., 1985). D'autres expériences de photomarquage ont été réalisées avec des photomarqueurs ayant subi une iodation à l'aide de l'isotope ¹²⁵I. Cette iodation des peptides s'est avérée nécessaire pour

obtenir une activité spécifique plus importante que celle obtenue avec les peptides tritiées (7-75 Ci/mmol). L'augmentation de l'activité spécifique à 1000-2000 Ci/mmol permet d'élever la sensibilité de détection des récepteurs. FAHRENHOLZ (1986) a évalué la masse moléculaire du récepteur V_1 avec le photomarqueur ^{125}I -[MPA¹, D-tyr², MeAla⁷, Lys(4-azidophenylamino)⁸]VP. Comme dans l'étude précédente avec un photomarqueur tritié, le récepteur V_1 semblait être formé de deux sous-unités soit une de 30 kDa et l'autre de 38 kDa (FAHRENHOLZ et al., 1986). Cependant suite au clonage du récepteur, on sait que le récepteur ne pourrait être dimérique tel que démontré par Fahrenholz. D'autres photomarqueurs iodés ont permis d'évaluer la masse moléculaire du récepteur hépatique glycosilé de rat (V_1) à 76 ± 8 et celle du récepteur rénal V_2 à 95 ± 4 Kdal (CRAUSE et al., 1984, GUILLON et al., 1989). Ces résultats discordants ont amené ESCHER et BARBEAU (1991) à faire une série d'analogues photo-activables, un photomarqueur: le ^{125}I -[DMPA¹, Phe(N₃)², Val⁴, Lys⁸, D-tyr⁹]VP s'est démarqué des autres. Celui-ci possédait une bonne affinité pour le V_1 malgré l'incorporation de l'azydophénylalanine en position 2 et de la tyrosine en position 9. Une masse moléculaire du récepteur glycosilé a été évaluée à 52 kDa. Cette masse se rapproche des résultats obtenus par la réticulation du récepteur tandis que la masse du récepteur déglycosilé, évaluée à 43 kDa (BARBEAU, 1991), se rapproche de la masse moléculaire déduite du clonage, soit 44 kDa. Ce résultat permet de penser que ce photomarqueur pourrait être un outil intéressant dans la purification du récepteur V_1 car il permet d'obtenir jusqu'à 2 % d'incorporation dans les récepteurs V_1 au lieu des ≤ 1 % obtenus avec d'autres réactifs (FAHRENHOLZ et CRAUSE, 1984).

NOTRE ETUDE

Après les études effectuées dans le laboratoire du Dr. ESCHER sur la synthèse d'analogues photoactivables spécifiques et sélectifs pour le récepteur V_1 , on a voulu synthétiser un analogues photoactivables sélectifs envers le récepteur V_2 . Nous avons donc fait une étude structure-activité d'analogues peptidiques d'AVP, afin d'identifier des analogues répondant à 4 critères: 1) un résidu photoactivable permettant un haut rendement de marquage, 2) un résidu propice pour l'incorporation d'iode radioactif, 3) une haute affinité, 4) une plus grande sélectivité pour l'un ou l'autre type de récepteur.

Pour notre étude nous avons utilisé comme groupement photoactivable un aryl cétone, le Bpa (p-Benzoyl phenylalanine). Dans une étude antérieure, un analogue de la substance P dans lequel on avait introduit le Bpa a démontré jusqu'à 70 % d'incorporation dans les récepteurs de la substance P (BOYD et al., 1991) tandis que le même analogue portant le résidu azidophenylalanine ne réussissait qu'une incorporation d'environ 1 % (DAM et al., 1987). Nous avons pensé que son incorporation dans un analogue d'AVP aurait comme résultat d'augmenter l'incorporation de l'analogue dans le récepteur d'AVP. La localisation du groupement Bpa en position 2 ou 3 a pour but de diminuer son apport d'hydrophobicité donc diminue le pourcentage de liaisons non spécifiques dans les membranes (BARBEAU et al., 1991).

Afin d'obtenir un analogue sélectif à V_1 à haut rendement de photomarquage, nous nous sommes inspirés de la structure de EE539, elle-même relié à la séquence du composé de

Manning [CPA¹, OMe-Tyr²] AVP (KRUSZYNSKI et al., 1980). Le Bpa a été alternativement substitué en position 2 ou 3. La synthèse pour un analogue sélectif pour le V₂ a été basée sur la séquence du premier agoniste cyclique sélectif V₂: le [MPA¹, Val⁴, D-arg⁸]VP ou le DVDAVP. La valine en position 4 a été remplacée par l'isoleucine ce qui augmente le rapport V₂/V₁ de 40 fois. La glycine en C-terminal a été enlevée. Cette glycine est essentielle pour l'activité biologique mais non pour la liaison, de plus cela augmente aussi la sélectivité pour les récepteurs V₂ (MANNING et SAWYER, 1991). La substitution du D-Arg pour le L-Arg en position 8 augmente la sélectivité de V₂/V₁ (THIBONNIER, 1990). La dernière modification a été celle d'insérer un résidu nitrophénylalanine en position 3 pour permettre l'iodation du peptide par la méthode de Gatterman-Sandmeyer (BOSSE et al, 1989). Cette technique est utilisée lorsqu'un analogue ne possède pas de résidu tyrosine sur lequel on iode en général par la technique à l'iodo-gen.

Dans cette étude, les analogues (tableau II) ayant les meilleures affinités et sélectivités seront caractérisés de façon pharmacologique et physicochimique. Après, ils seront utilisés pour l'étude de la caractérisation biochimique des récepteurs sur des gels de polyacrylamide (SDS-PAGE).

Tableau II Structure et propriétés physico-chimiques des analogues photosensibles d'AVP synthétisés

#	Nom	Séquence	Masse	RF	
			FAB/MS	BAW	BAWP
.....	AVP	<u>Cys-Tyr-Phe-Gln-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH₂</u>
EE 539	[DMPA ¹ ,Phe(N ₃) ² ,Val ⁴ ,Lys ⁵ ,D-tyr ⁹] VP	<u>DMPA-Phe(N₃)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Lys-D-tyr-NH₂</u>	1171.42	0.55	0.82
EE 654	[DMPA ¹ ,Phe(NO ₂) ² ,Val ⁴ ,Lys ⁵ ,D-tyr ⁹] VP	<u>DMPA-Phe(NO₂)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Lys-D-tyr-NH₂</u>	1175.00	0.55	0.82
EE 655	[DEPA ¹ ,Phe(NO ₂) ² ,Val ⁴ ,Lys ⁵ ,D-tyr ⁹] VP	<u>DEPA-Phe(NO₂)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Lys-D-tyr-NH₂</u>	1203.00	0.51	0.80
EE 657	[DMPA ¹ ,Tyr(OEt) ² ,Val ⁴ ,Lys ⁵ ,D-tyr ⁹] VP	<u>DMPA-Tyr(OEt)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Lys-D-tyr-NH₂</u>	1174.00	0.10	0.23
EE 683	[DMPA ¹ ,Bpa ² ,Val ⁴ ,Lys ⁵ ,D-tyr ⁹] VP	<u>DMPA-Bpa-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Lys-D-tyr-NH₂</u>	1234.00	0.51	0.80
EE 684	[DMPA ¹ ,Tyr ² ,Bpa ³ ,Val ⁴ ,Lys ⁵ ,D-tyr ⁹] VP	<u>DMPA-Tyr-Bpa-Val-Asn-Cys-Pro-Lys-D-tyr-NH₂</u>	1265.00	0.52	0.80
EE 692	[DMPA ¹ ,D-Bpa ² ,Phe(NO ₂) ³ ,Ile ⁴ ,desGly ⁹] VP	<u>DMPA-D-Bpa-Phe(NO₂)-Ile-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂</u>	1159.00	0.53	0.76
EE 693	[CPA ¹ ,D-Bpa ² ,Phe(NO ₂) ³ ,Ile ⁴ ,desGly ⁹] VP	<u>CPA-D-Bpa-Phe(NO₂)-Ile-Asn-Cys-Pro-Arg-NH₂</u>	1199.00	0.42	0.26
EE 696	[CPA ¹ ,D-Ile ² ,Phe(NO ₂) ³ ,Ile ⁴ ,Bpa ⁹] VP	<u>CPA-D-Bpa-Phe(NO₂)-Ile-Asn-Cys-Pro-Arg-Bpa-NH₂</u>	1311.00	0.41	0.79
EE 717	[CPA ¹ ,D-Bpa ² ,Phe(NO ₂) ³ ,Ile ⁴ ,desGly ⁹] VP	<u>CPA-D-Bpa-Phe(NO₂)-Ile-Asn-Cys-Pro-Arg-OH</u>	1198.00	0.42	0.26
	Composé de Manning	<u>CPA-Tyr(OEt)-Phe-Val-Asn-Cys-Pro-Arg-Gly-NH</u>

DMPA: β,β-dimethyl-β-mercaptopropionyl, DEPA: β,β-diethyl-β-mercaptopropionyl, CPA: β,β-cyclopentamethylene-β-mercaptopropionyl, RF: référence de front de migration, BAW: butanol,acide acétique, eau, BAWP: butanol, acide acétique, eau, pyridine

Bien que les photomarqueurs que nous avons développés dans cette étude ont de bonnes affinités et spécificités pour les récepteurs d'AVP, nous avons voulu produire un outil de recherche encore plus sélectif ayant une plus grande affinité pour le récepteur. Nous avons développé des anticorps polyclonaux dirigés contre des séquences spécifiques du V_2 ou du V_1 de rat. Par le passé, un anticorps monoclonal dirigé contre le récepteur entier a été produit. Cependant l'anticorps reconnaissait un épitope commun à toutes les classes de récepteurs d'AVP, il n'était donc pas sélectif. De plus, cet anticorps pouvait reconnaître aussi l'OTR (TRINDER et al., 1993). Il était donc important que les anticorps soient très sélectifs à V_1 ou à V_2 pour obtenir un outil valable pour la recherche.

Pour obtenir un anticorps sélectif, nous avons pris une séquence très spécifique du V_1 ou du V_2 . Grâce au clonage des récepteurs nous avons pu comparer les séquences de V_1 et V_2 de rat aux récepteurs de l'oxytocine humaine et porcine (KIMURA et al., 1992, GORBULEV et al., 1993), de V_2 humain (GORBULEV et al., 1993), de l'interleukine 3 (ITOH et al., 1990), de l'angiotensine II (MURPHY et al., 1991), de la thyrotropine (NAGAYAMA et al., 1989, PARLEMENTIER et al., 1989), de la substance P (YOKOTA et al., 1989), de la somatostatine (YAMADA et al., 1992) et de la substance K (MASU et al., 1987). Deux séquences très spécifiques à V_1 et deux autres pour V_2 ont été sélectionnées. Une cinquième séquence a été choisie et synthétisée en tenant compte du principe du mixotope qui sera expliqué plus tard. Cette dernière séquence permet d'obtenir un sérum contenant des anticorps qui reconnaissent tous les récepteurs de l'AVP et de l'OTR de manière spécifique mais non sélective. Les anticorps obtenus après

immunisation de lapins nous ont servi dans plusieurs études: la caractérisation des masses moléculaires des récepteurs glycosilés V_1 et V_2 et la masse moléculaire du V_1 . Ils ont permis de caractériser la nature des récepteurs d'AVP contenus dans une lignée cellulaire de l'épithélium du tubule proximal de rein humain. Dans le futur, ces anticorps pourront être de bon outils pour la purification des récepteurs d'AVP et pour la localisation des récepteurs d'AVP dans des tissus où le nombre de récepteurs ou l'état fonctionnel du récepteur ne permet pas sa détection par des essais de liaisons.

Notre étude pourrait se résumer en deux objectifs: synthétiser des analogues peptidiques photoactivables spécifiques à la vasopressine et sélectifs envers V_2 et élaborer des sérums contenant des anticorps très sélectifs envers un seul type de récepteur vasopressinergique soit V_1 ou V_2 .

MATERIELS ET METHODES

1. SYNTHÈSE PEPTIDIQUE

1.1 Synthèse peptidique des analogues d'AVP et des séquences antigéniques

Les analogues peptidiques de la vasopressine et les peptides antigéniques ont été synthétisés sur phase solide selon l'adaptation générale de la synthèse en phase solide (MERRIFIELD, 1963). La synthèse consiste par la liaison d'un acide aminé (Boc-A.A) sur une résine. Les acides aminés (Boc-A.A) activés se lient au précédant jusqu'à l'obtention de la séquence peptidique complète. Les A.A attachés à la résine ont plus d'un site réactionnel potentiel où un Boc-A.A activé peut réagir soit: un site amine déprotégé par la perte du tert-butyloxycarbonyl (Boc) ou un site de réaction sur la chaîne latérale de l'A.A. qui est protégé par un groupement beaucoup plus stable que le Boc dans les conditions de synthèse normal comme le toluenesulfonyl (TOS) ou le groupement 2-chlorobenzoyloxycarbonyl (2-Cl-CBZ). Pour éviter le développement de produit secondaires qui sont souvent le résultat de réactions du BOC A.A activé avec le groupement déprotégé d'une chaîne latérale, les conditions de temps, la force des acides et des bases utilisés, le choix des groupements protecteurs des chaînes latérales ont été faits pour se conformer au principe de l'"orthogonalité"; ainsi dans nos conditions expérimentales, seul le groupement Boc a été enlevé, tous les autres groupements étant plus stable dans ces conditions. Le programme de synthèse que nous avons utilisé est illustré au tableau III. Les produits de la synthèse sont répertoriés au tableau IV et V.

Deux types de résines ont été utilisés en fonction du groupe fonctionnel C-terminal

désiré; une résine benzhydrylamine (BHA) pour les peptides ayant une fonction C-terminal de type carboxamine et une résine Merrifield pour les peptides ayant un groupement carboxyl libre.

Pour expliquer les différentes phases de la synthèse, nous prendrons un exemple concret: la synthèse du EE717 sur une résine Merrifield.

Le premier dérivé d'A.A., le Boc-Arg (Tos) est estérifié à la résine. Un gramme et six dixième de Boc-Arg (Tos) est dissous dans 5 ml d'éthanol et 2 ml de H₂O. Le pH est ajusté à 7 avec une solution aqueuse de 22 % de bicarbonate de césium. La solution subit trois extractions au benzène, après évaporation, on obtient une poudre blanche. Ce sel de césium de Boc-Arg (Tos) est dissous dans le N,N diméthylformamide (DMF). Dans un ballon de 250 ml on introduit le Boc-Arg (Tos) et 5 g de résine Merrifield (200-400 mesh, 2% de réticulation avec divinyl benzène ou 0.75 méq Cl par g de résine). On ajoute du DMF pour gonfler la résine. Après 16 heures d'incubation à 50°C sous agitation, la résine est filtrée et lavée successivement avec DMF: H₂O (1:1), MeOH, CH₂Cl₂.

La résine Boc-Arg (Tos) est introduite dans le réacteur . Le groupement Boc qui est labile aux acides forts dilués et stables aux bases et à l'hydrogélyse (CARPINO et al., 1956) est mis en contact avec l'acide trifluoroacétique (40% TFA/CH₂Cl₂) pendant 15 min. La résine, qui a subi la déprotection, est lavée 3 fois avec CH₂Cl₂ pour enlever l'excès de TFA. Deux lavages au N,N-diisopropyléthylamine (DEA/CH₂Cl₂) sont nécessaires pour neutraliser les sels de TFA. La séquence peptidique est maintenant prête à réagir avec un autre Boc-A.A. activé.

Ce dernier Boc-A.A. introduit dans le réacteur a été activé par la méthode des anhydrides symétriques (WIELAND et al., 1973). La réaction de couplage dure pendant 60 min. après quoi la résine est lavée 3 fois à l'isopropanol et au CH_2Cl_2 . Un échantillon de la résine est prélevé pour être analysé qualitativement à l'aide du test à la ninhydrine (KAISER et al., 1970). La présence de sites actifs (amines) donne une coloration aux billes de la résine. Si le test est positif, un second couplage est nécessaire. Le second couplage est différent du premier. On utilise une activation dite HOBt-DCC directe (BLAKE et LI, 1975). Après un second test à la ninhydrine positif, on bloque les groupes amines libres par acétylation avec de l'acide acétique anhydride (STEWART et YOUNG, 1983) L'acétylation peut se répéter une seconde fois, si par la suite une coloration persiste, on la considère comme un contrôle négatif pour la suite de la synthèse.

Pour chaque Boc-A.A. qui est incorporé dans la séquence peptidique, la boucle d'évènement est reprise. Lorsque le dernier Boc-A.A. est finalement couplé, on clive le peptide de la résine, le groupement Boc ainsi que tous les groupements protecteurs latéraux (KISO et al., 1980).

Une résine benzyldrylamine (BHA, 0.75 méq par g de résine) a été utilisée pour la synthèse de plusieurs analogues peptidiques d'AVP. La résine est neutralisée par une incubation de 30 min. dans une solution de 20% triéthylamine/chloroforme. La résine ainsi neutralisée est introduite dans le réacteur où les couplages ont été faits comme décrits précédemment.

Tableau III Programme de la synthèse semi-automatique des peptides en phase solide.

Etape de la synthèse		Solvant	Temps de mélange (min)
A) Résine Merrifield			
- Estérification du 1 ^{er} Boc-A.A			
- Procéder à l'étape 1			
B) Résine BHA			
- Neutralisation de la résine		10% TEA/CHCl ₃	
- Procéder à l'étape 7		10% TEA/CHCl ₃	
1	Déprotection pré lavage	40% TFA/CH ₂ Cl ₂	1.5
2	Déprotection	40% TFA/CH ₂ Cl ₂	15
3	Lavage (3X)	CH ₂ Cl ₂	1.5
4	Neutralisation pré lavage	5% DEA/CH ₂ Cl ₂	1.5
5	Neutralisation	5% DEA/CH ₂ Cl ₂	3
6	Lavage (2X)	CH ₂ Cl ₂	1
7	Couplage	DMF/CH ₂ Cl ₂	60
8	Lavage	Isopropanol	2
9	Lavage	CH ₂ Cl ₂	1
10	Lavage	Isopropanol	2
11	Lavage (3X)	CH ₂ Cl ₂	1.5
12	Test à la ninhydrine		
13	Retour à l'étape 1 ou 7 selon le résultat du test à la ninhydrine		

Tableau IV Liste des réactifs et solvants utilisés pour la synthèse peptidique

Nom	Abréviations	Source
Acide acétique		Fisher
Acide chloridrique		Anachemia
Acide trifluoroacétique	TFA	Halocarbon
Anhydride acétique		Anachemia
Bicarbonate de Césium		Alfa
Carbonate de sodium		Fisher
Chloroforme		Fisher
Cyanure de potassium		Fisher
Dichlorométhane	CH ₂ Cl ₂	Fisher
N,N-dicyclohexylcarbodiimide	DCC	Eastman
N,N-diisopropyl éthylamine	DEA	Aldrich
N,N-diméthylformamide	DMF	Fisher
Ethanol		Fisher
Ferricyanide de potassium		J.T. Baker
Fluorure d'hydrogène	HF	AlphaGaz
Hydroxyde d'ammonium		J.T. Baker
Hydroxyde de potassium		Fisher
N-hydroxybenzotriazole	HOBT	Nova biochem
ninhydrine		Fisher
Phénol		Aldrich
pyridine		Aldrich
Sulfate de magnésium anhydre		Fisher
tert-butylpyrocarbate		Fisher
Triéthylamine		Sigma

Tableau V Liste des acides aminés et leurs dérivés utilisés pour la synthèse peptidique

Acide aminé	Abréviation	dérivé protégé
Acide aspartique	Asp	Boc-Asp(OBzl)
Acide glutamique	Glu	Boc-Glu(OBzl)
Alanine	Ala	Boc-Ala
Arginine	Arg	Boc-Arg(Tos)
Asparagine	Asn	Boc-Asn
β,β -cyclopentamethylene- β -mercaptopropionyl	CPA	
β,β -diethyl- β -mercaptopropionyl	DEPA	
β,β -dimethyl- β -mercaptopropionyl	DMPA	
Cystéine	Cys	Boc-Cys(MBzl)
Glutamine	Gln	Boc-Gln(OBzl)
Glycine	Gly	Boc-Gly
Histidine	His	Boc-His(Tos)
Leucine	Leu	Boc-Leu
Lysine	Lys	Boc-Lys(2-CL-CBZ)
Phénylalanine	Phe	Boc-Phe
p-Benzoyl phenylalanine	Bpa	Boc-Bpa
p-Nitro-Phénylalanine	Phe(NO ₂)	Boc-Phe(NO ₂)
Proline	Pro	Boc-Pro
Sérine	Ser	Boc-Ser(OBzl)
Threonine	Thr	Boc-Thr(Bzl)
Thryptophane	Trp	Boc-Trp(Bzl)
Tyrosine	Tyr	Boc-Tyr(2-Br-Z)
Valine	Val	Boc-Val

Boc: tert-butyloxycarbonyl,

O-M-Bzl: O-M-benzyl,

2-CL-CBZ: 2 chlorobenzyl-oxycarbonyl,

Tos: toluenesulfonyl,

Bzl: benzyl

2-Br-Z: 2 bromobenzylloxycarbonyl,

1.2 Cyclisation des analogues peptidiques d'AVP

Après le clivage, tous les peptides sont linéaires. Les analogues d'AVP contrairement aux peptides servant pour l'immunisation requièrent une cyclisation. Pour obtenir la cyclisation du peptide, on favorise une oxydation des résidus cystéine afin d'imiter la forme de l'hormone naturelle. Pour cela les peptides ont été dissous dans l'acide acétique 25% ou 50%. Le pH a été ajusté à 8 à l'aide d'hydroxyde d'ammonium avant d'ajouter 150 mg de ferricyanide de potassium. Après une heure d'agitation, la solution est évaporée et lyophilisée.

1.3 Purification des peptides

Les analogues d'AVP cyclisés et les peptides antigéniques linéaires doivent subir une série de purifications. La première purification a été faite par chromatographie d'exclusion. Les peptides ont été dissous dans l'acide acétique 50% et déposés sur la colonne LH-20 (Séphadex 25-100 μ m, 26 x 2.5 cm). L'élution a été faite à l'aide du DMF distillé et les fractions (5 ml) ont été récoltées. Cette purification sépare principalement les sels des peptides. Cependant la chromatographie permet de séparer grossièrement le peptide des sous-produits peptidiques de synthèse qui sont plus petits que lui.

La localisation du peptide a été vérifiée par chromatographie sur couche mince (CCM). La migration s'effectue sur une plaque de gel de silice de 0.2 mm d'épaisseur (EM Industrie, Gibbstown, Allemagne) avec comme éluant le BAW (butanol:acide acétique:eau, 5:2:3). La plaque est colorée à l'aide de la ninhydrine comme décrit par

VON ARX et al. (1975). Lorsque la migration est complétée, la fraction de l'éluant contenant le peptide est évaporée sur un évaporateur rotatif. Après avoir été redissoute dans l'eau, la solution est lyophilisée.

Après la lyophilisation du peptide, celui-ci a été purifié une seconde fois. Le peptide est dissout dans un minimum d'eau.TFA 0.5% avant d'être déposé sur une colonne C-18 (25 x 1 cm). Un gradient de 1 à 100 % eau/acétonitrile.TFA 0.5 % a été utilisé. L'"éluat" (100 ml) a été recueilli en fraction d'un ml. La CCM a permis de mettre en évidence la localisation et la pureté.

Un échantillon de 10 µl est introduit dans un appareil d'HPLC ("high performance liquid chromatography") analytique. L'appareil 625 LC de la compagnie Waters a été muni d'une colonne C-18 (3.9 x 300 mm, µbondapak, Waters). Un gradient de 1 à 60 % eau/acétonitrile.TFA 0.5 % a été utilisé. Le profil d'absorption (214 nm) de l'élution a été observé durant la purification des peptides.

1.4 Caractérisation des peptides

La pureté des analogues d'AVP ont été vérifiée par spectrométrie de masse (Fast Atom Bombardement) et par chromatographie sur couche mince (CCM). Les systèmes de solvants de la CCM ont été le BAW (Butanol:Acide acétique:Eau, 5:2:3) et le BAWP (Butanol:acide acétique:eau:pyridine, 30:6:20:12). Les structures des analogues peptidiques ainsi que les indices de migration sont illustrées au tableau II (page 12). La pureté des peptides a été vérifiée par l'analyse des A.A après l'hydrolyse acide.

2 PREPARATIONS MEMBRANAIRES

Trois sortes de préparations membranaires ont été utilisées lors des nos expériences. L'une a été constituée de protéines membranaires de foie et l'autre de protéines provenant de rein de rat Long Evans (250 g). La troisième préparation, celle de plaquettes sanguines a été fournie par le Dr THIBONNIER.

2.1 Préparations des membranes de foie de rat.

Les membranes de foie ont été préparées selon la méthode de Neville (NEVILLE et al, 1968). Les foies (3 à 5) ont été préservés à 4°C dans un tampon bicarbonate de soude 1mM pH 7.4. Le tissu a été découpé en petits morceaux et homogénéisé à l'aide d'un appareil Potter-Elvehjem" en téflon. L'"homogénat" a été filtré successivement sur deux et quatre épaisseurs de tissu de mousseline. Le filtrat a été centrifugé à 1 500 xg, 10 minutes à 4°C (IEC model B-20, rotor GS-3). Le culot a été resuspendu dans 50 ml d'une solution de sucrose de 69 %. La solution est ajustée à 44 % de sucrose à l'aide du tampon ou de la solution de sucrose 69 %. Le pourcentage de sucrose a été déterminé à partir d'un réfractomètre. Cette solution de 44 % a été utilisée dans la formation d'un gradient discontinu de 42.3-44%. Le gradient a été centrifugé pendant deux heures à 100 000 xg (Beckman l8-70, rotor SW-28). Les membranes ont été recueillies flottant sur la partie supérieure du gradient, les protéines flottantes sont resuspendues dans un tampon bicarbonate pH 7.4 et centrifugées 10 minutes à 10 000 xg (Sorvall RC 2-B, rotor Sorvall SS-34). Le culot a été resuspendu dans 20 ml de tampon bicarbonate pH 7.4. La

solution membranaire a été fractionnée et centrifugée à 13 000 xg (micro-centrifugeuse Biofuge A (Beckman)). Le "surnageant" a été enlevé, le culot a été gelé dans l'azote liquide et conservé à -80°C.

2.2 Préparation des membranes de rein de rat

Les membranes de rein ont été préparées par la méthode de RAJERISSON (1974) qui donne une préparation brute. Les reins de 10 rats ont été excisés et recueillis dans un tampon isotonique à 4°C: 5mM Tris/HCl pH 7.4, 3 mM MgCl₂, 1mM EDTA, 250 mM sucrose. Les reins dégagés de leurs capsules et des tissus conjonctifs ont été placés dans un tampon hypotonique: 5mM Tris/HCl pH 7.4, 3mM MgCl₂, 1mM EDTA. Le tissu homogénéisé comme précédemment a été filtré sur une mousseline. Le filtrat a été centrifugé à 800 xg pendant 15 min. (rotor SS 34). Le "surnageant" a été centrifugé à 25 000 xg durant 10 minutes resuspendu a été centrifugé à 19 500 xg durant 15 minutes (rotor SS 34). Le culot final a été resuspendu et fractionné (1 ml). La quantité de protéines des deux préparations membranaires a été évalué par la méthode de Lowry (LOWRY et al. 1951). Une courbe étalon du dosage des protéines a été illustré à la fig 1. La quantité de protéines a été estimée à 8 mg de protéines par ml de préparation membranaire hépatique et à 18 mg par ml de préparation de protéines membranaires rénales.

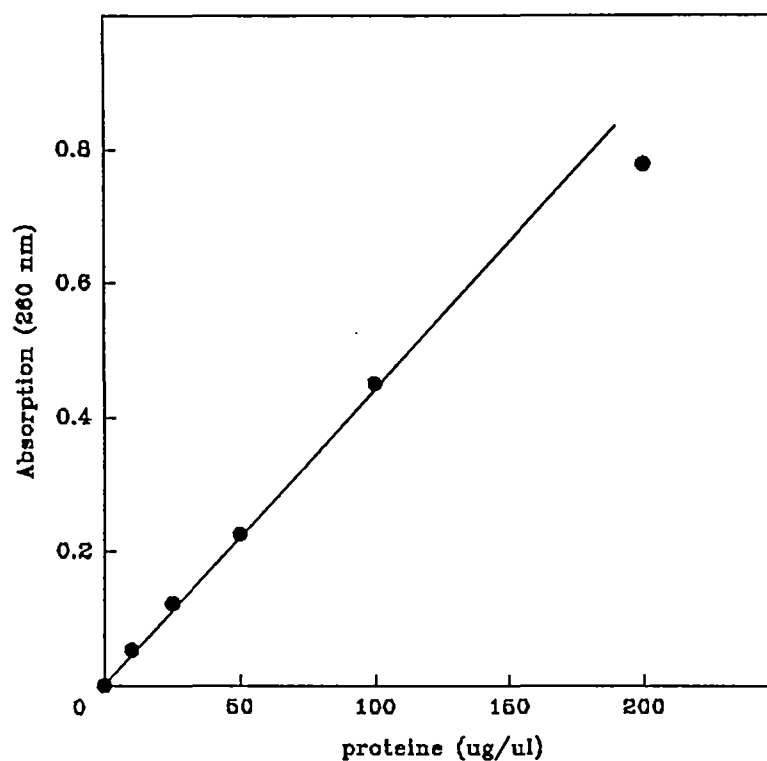


Fig 1 COURBE ETALON POUR LE DOSAGE DE PROTEINES

La figure 1 illustre l'absorption à 260 nm d'une solution d'albumine sérique bovine (BSA) de différentes concentrations traitées selon le protocole de Lowry et al. (1956). Chaque point représente la moyenne de deux échantillons.

3 ETUDE DE LIAISON DES ANALOGUES PEPTIDIQUES D'AVP

3.1 Courbes dose-déplacement du ^3H -AVP par des doses croissantes d'analogues d'AVP

L'étude du déplacement de l' ^3H -AVP (75.8 Ci/mmol, Dupont) par des doses croissantes d'analogues spécifiques d'AVP a été utilisée pour différencier les analogues

sélectifs au récepteur V_1 , de ceux qui sont sélectifs à V_2 . Une expérience typique peut-être décrite brièvement comme une série de tubes à 4°C contenant tous un volume de 50 μ l d'une solution d' ^3H -AVP (860 nM pour les membranes hépatiques et 430 nM pour les membranes rénales). Dans ces tubes, un volume de 50 μ l d'une concentration variant de 1 μ M à 1 pM d'AVP (Parke-Davis) a été ajouté. La liaison non-spécifique correspond à la liaison en présence de 1 μ M d'AVP. Tous les points d'une série ont été faits en duplicata.

Une incubation à la température de la pièce commence lors de l'ajout des 100 μ l de tampon contenant 50 μ g de protéines hépatiques ou 500 μ g de protéines rénales. L'incubation des membranes hépatiques a été de 30 min., celle des membranes rénales de 45 min.. A la fin de l'incubation, La solution membranaire a été filtrée sur des filtres de fibre de verre (type A/E, Gelman Sciences) sous un vide de 200 mm de mercure. Les tampons utilisés sont différents selon la préparation utilisée. La préparation hépatique requiert un tampon d'incubation composé de Tris/HCl 50 mM pH 7.4, MgCl_2 3mM, BSA 0.1%, bacitracine 0.1%. Le tampon utilisé lors du lavages ne contenait pas de BSA ou de bacitracine(FAHRENHOLZ et al., 1986).

La préparation rénale requiert un tampon HEPES (N-2 hydroxyéthylpiperarine): HEPES 25 mM pH 8.2, MgCl_2 2mM, BSA 0.1%, bacitracine 0.1%. Le tampon de lavage pour sa part est constitué de Tris/HCl 25 nM pH 8.2, MgCl_2 2 mM, (CRAUSE et FAHRENHOLZ, 1982).

Tous les filtres ont été séchés pendant 24 heures et ont été mis en contact avec 3 ml de liquide à scintillation (Ready-gel de Beckman). Après six heures les flacons à scintillation ont été introduits dans un compteur β (Beckman LS 6800) donc l'efficacité est de 0.30 cpm/dpm.

4 IODATION DES ANALOGUES DE LA VASOPRESSINE

Deux méthodes d'iodation ont été utilisées dans notre étude soit la méthode à l'iodo-gen et la méthode de Gatterman-Sandmeyer.

4.1 Iodation de peptide par la technique à l'Iodo-gen

L'Iodo-gen permet à l'iode de s'incorporer en position méta sur le cycle phénolique de la tyrosine (SEEVERS et COUNSELL, 1982). La plupart de nos analogues tels le EE539 et le EE683 ont été iodés à l'aide de ce produit et suivant le protocole décrit par le Dr ESCHER (1984). Un mg d'Iodo-gen (PIERCE Chemical) a été dissous dans 10 ml de chloroforme. Cinquante μ l de cette solution ont été déposés dans des tubes en polyéthylène. Le chloroforme a été évaporé sous un jet d'azote. Une mince couche de réactif s'est déposée sur les parois du tube.

On a déposé dans un tube contenant l'Iodo-Gen: 100 μ l de KH_2PO_4 1M, 50 μ l d'une solution 0.1 mM de peptide et 1mCi de Na^{125}I (100mCi/ml, Amersham). Après 30

minutes, la réaction a été arrêtée par l'aspiration du contenu à l'aide d'une seringue contenant 200 µl d'une solution de Na_2SO_3 1M et KI 1M. Le Na_2SO_3 réduit l'iode libre formant un sel d'iode restreignant du même coup la diffusion et la dispersion de l'isotope d'iode au cours de l'élution sur la colonne C-18 de l'HPLC et le KI dilué isotopiquement. L'"éluat" a été recueilli par fraction d'un ml et la radioactivité de chacune de ces fractions a été évaluée à l'aide d'un compteur gamma (LKB 1271 RiaGamma).

4.2. Iodation d'un peptide par la méthode de Gatterman-Sandmeyer

Cette technique permet d'ioder l'analogue peptidique sélectif à V_2 . Nous avons utilisé cette méthode qui introduit l'iode sur une phénylalanine en position para car l'analogue EE693 ne possède pas de tyrosine. Le produit contenant une nitrophénylalanine doit-être modifié pour être transformé en amino-phénylalanine. Le groupement amino a été converti en sel de diazonium et sous l'influence d'un catalyseur cuivrique, fut substitué par le ^{125}I ode. Le mécanisme de la réaction est illustré à la figure 2.

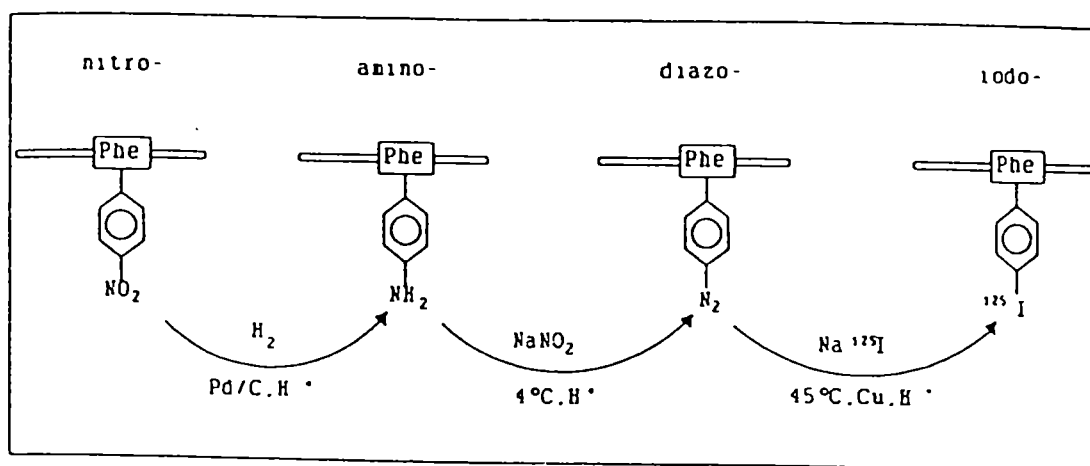


Fig 2 Mécanisme simplifié de l'iodation par la réaction de Gatterman/Sandmeyer.

Cette réaction consiste essentiellement à substituer le groupement nitro d'un dérivé synthétique d'un peptide par du ^{125}I . La deuxième étape est induite par un catalyseur métallique (Cu).

Le catalyseur cuivrique a été préparé selon Suehiro (1987). Cinquante mg de zinc fin (325 mesh, Aldrich) sont mélangé avec 200 μl de CuSO_4 0.5 M et de 500 μl de H_2SO_4 2N a été préparé. Le produit de la poudre de cuivre a été soniqué pendant 30 secondes et lavé trois fois à l'eau avant d'être resuspendu dans 1 ml d'eau.

Un mg de peptide contenant une nitrophénylalanine a été dissous dans 500 μ l d'acide acétique 0.2 N dans une bouteille de 3 ml. Une pincée de palladium sur charbon 10 % (Matheson Coleman et Bell) a été ajoutée. Après avoir fait l'échange de l'atmosphère dans la bouteille pour de l'hydrogène, 10 ml d'hydrogène ont été introduits à l'aide d'une seringue augmentant la pression intérieure à environ 10 atmosphères. Après 1 heure d'agitation, le peptide est réduit pour obtenir l'aminophénylalanine. Celui-ci est filtré sur une colonne de 1 cm^3 de cellulose. L'élution s'est faite avec 2 ml d'acide acétique 0.2 N contenant 0.01 % de mercaptoéthanol pour désorber les peptides liés au catalyseur. Le filtrat a été lyophilisé à plusieurs reprises pour permettre une recyclisation du peptide par l'oxygène atmosphérique. Du sulfate de sodium (3 mg) a été ajouté au filtrat avant la lyophilisation, afin de diminuer la perte de peptide par absorption sur les parois du tube.

Après la réduction de la nitrophénylalanine, les deux dernières étapes pour obtenir le peptide iodé ont été entreprises. Toute l'expérience a été faite sur la glace en absence de lumière. Cinq cent mg de peptides ont été dissous dans 1 ml d'acide sulfurique 0.1 N pour obtenir une concentration finale de 1 mM. Trois équivalents molaires de nitrite de sodium ont été ajoutées. L'expérience a été faite sous atmosphère d'azote. Après 10 min. de réaction, 3.5 équivalent molaire d'acide sulfamique ont été introduits pour détruire l'excès de NO_2^- . On obtient un analogue diazoté très instable. Dans une nouvelle bouteille de 3 ml, on a mis 200 μ l de H_2SO_4 1 N, 100 μ l de peptide diazoté (1 mM), 10 μ l de Na^{125}I (1 mCi) et 200 μ l de suspension du catalyseur. Le mélange a été placé sous agitation à 4°C. Après 16 heures, le pH a été ajusté à 7 à l'aide d'une solution d'acétate d'ammonium. Le mélange a été aspiré avec une seringue contenant 200 μ l de KI 1M et

de NaHSO_3 1M et a été injecté sur une colonne d'HPLC (Waters model 660, colonne C-18). Un gradient (60 ml) de 0 à 100 % d'eau/acétonitrile .TFA 0.5 % a été débité à 1 ml par minute. L'éluat a été récolté et fractionné en aliquotes d'un ml. Le peptide a été retracé par la radioactivité évaluée à l'aide d'un compteur gamma et utilisé dans une expérience de liaison sur des membranes de foie ou de rein pour vérifier la capacité de liaison du peptide iodé récolté.

5 PHOTOMARQUAGE DU RECEPTEUR V_1 PAR UN ANALOGUE SELECTIF

L'iodation des peptides photomarqueurs sélectifs à V_1 a permis de photomarquer le récepteur V_1 . Cinq cents μg de protéines membranaires de foie de rat ont été incubées en présence d'analogues radio-iodés d'AVP (1 nM). L'incubation a été faite en présence ou non de 1 μM d'analogue spécifique d'AVP. Les compétiteurs sont soit un agoniste tel l'AVP ou un antagoniste sélectif à V_1 tel le composé de Manning. Après 30 min. d'incubation dans le tampon utilisé dans l'étude de liaison, les membranes ont été centrifugées à 13 000 xg (rotor SS 34) et le culot resuspendu dans 1 ml du tampon de lavage Tris/HCl 50 mM pH 7.4, MgCl_2 3 mM. La solution membranaire a été exposées sous quatre lampes à ultra-violets (100 watts, à vapeur de mercure, JC-par-38 Westinghouse) équipées de filtres (Raymaster black light filter, no 5873, Gates and co. INC N.Y). Après 20 min. d'expositions à 365 nm , le complexe membrane-ligand a subit 3 lavages avant d'être dilué dans le tampon d'électrophorèse (GUILLEMETTE, 1982).

6 ELECTROPHORESE SUR GEL DE POLYACRYLAMIDE (SDS-PAGE)

6.1 Préparation des échantillons d'électrophorèses

6.1.1 Préparation des protéines membranaires de foie glycosylées

Les protéines membranaires hépatiques et rénales non-radiomarquées ainsi que les protéines membranaires de foie photomarquées en présence ou non d'1 μ M d'analogue d'AVP ont reçu le même traitement. Les membranes ont été mises dans la même solution dénaturante que les protéines du témoin afin obtenir une concentration de 50 μ g de protéine par 25 μ l de tampon de dénaturation (Tris/HCl 62.5 mM pH 6.8, glycérol 12.5 %, SDS 1.25 %, 2-mercaptoéthanol 1.25 % bleu de bromophénol 0.0025 %). Les protéines témoins et les échantillons ont été placés à 99 °C (5 min.) avant d'être déposés sur le gel.

6.1.2 Préparation des protéines membranaires de foie déglycosylées

Après le photomarquage des membranes hépatiques de rat, deux échantillons de 100 μ g de protéines membranaires photomarquées ont été incubées 1 heure dans 83.5 μ l de tampon phosphate 250 mM pH 8.1, EDTA 10 mM, SDS 0.1%, Nonidet P-40 0.6%, BSA 0.1%, bacitracine 0.1%, β -mercaptoéthanol 10 mM. Après ce temps d'incubation, on a ajouté 3 unités de glycopeptidase F (EC 3.2.2.18) dans l'un de échantillon et un volume

égal de tampon dans l'autre. Après 18 heures d'incubation à 37°C, les deux échantillons: le témoin négatif de l'action de la déglycosylation et l'échantillon ayant subi la déglycosylation ont été centrifugés à 13 000 xg et resuspendus dans le tampon de dénaturation décrit plus haut. (GREORIACLIS et al., 1988)

6.2 Migration sur SDS-PAGE 3-12 %

Un appareil à électrophorèse Bio-Rad, modèle 220 à deux gels de 10x10x0.75 cm a été utilisé. Un gel séparateur long de neuf centimètres de 12% d'acrylamide a été coulé. Après polymérisation du gel séparateur, un gel concentrateur de 3% d'acrylamide a été coulé et le peigne inséré. Cinquante µl d'échantillons d'électrophorèse ont été déposés par puits. La migration des deux préparations de protéines références de masse moléculaire, de la préparation de protéines références de masse pré-teint et de l'échantillons d'électrophorèse commence lorsqu'un courant est appliqué à travers le gel 3-12 %. Au début de la migration, 20 mA par gel ont été appliqués, lorsque le front de bleu de Bromophénol a entré dans le gel séparateur, le courant a été augmenté à 30 mA par gel. La migration a été arrêtée lorsque le front de bleu de Bromophénol a sortie dans le tampon d'électrophorèse Tris/HCl 25 mM pH 8.4, Glycine 200 mM, SDS 0.1 % (environs 3heures) ou lorsque la première bande visible de la préparation de protéines références de masse pré-teint se situe près de la fin du gel (environs 7 heures).

6.3 Mise en évidence des bandes

6.3.1 Coloration au bleu de Coomassie

Le gel de polyacrylamide 12 % a été trempé une heure dans une solution de coloration de bleu de Coomassie (50 % de méthanol, 40 % d'eau, 10 % d'acide acétique et 1 % de bleu de Coomassie (w/v)(Scientific products LTD, Canada). Après 30 min. le gel coloré a été incubé dans un milieu de décoloration (50 % de méthanol, 40 % d'eau, 10 % d'acide acétique). Après 12 heures, seules les protéines sont restées colorées en bleues. Le gel a été séché sur un papier filtre (Bio-Rad model 583) à l'aide d'un séchoir sous vide.

6.3.2 Mise en évidence des bandes radioactives

Les gels séchés ont été découpés en bande de 1cm de largeur. Ces bandes ont été découpés sur leurs longueurs en minces lanières de 2 mm d'épaisseur. La radioactivité de chaque lanière a été évaluée sur le compteur gamma. La masse du récepteur V_1 a été évaluée en comparant la distance de migration du pic radioactif spécifique à celles des étalons de masses moléculaires. Le pic de radioactivité spécifique a été déterminé par la différence de signaux entre la bande où le photomarquage a été réalisé par compétition en présence d'analogie d'AVP et la bande correspondante où il n'y a pas eu de peptide compétiteur présent.

La migration du gel peut être évaluée par autoradiographie. On a exposé le gel séché sur un papier buvard à un film Kodak (X-OMAT AR) à l'obscurité pendant 3 semaines.

Après ce délai, le film a été développé. On a pu alors déceler plusieurs taches radioactives sur le film, certaines représentant les récepteurs d'AVP.

La migration du gel peut être évaluée par un lecteur de phosphorescence. Le gel a été exposé à une cassette sensible à la radiation gamma émit par l' ^{125}I . L'exposition requise est 5 fois moins longue que celle requise par autoradiographie, soit 4 jours. Cette cassette a été introduite dans le l'appareil (GS-250, Bio-Rad). L'ordinateur analyse la phosphorescence de la surface de la plaque. Un programme informatique reproduit les résultats de l'analyse sous forme graphique. Une image des taches a été imprimée.

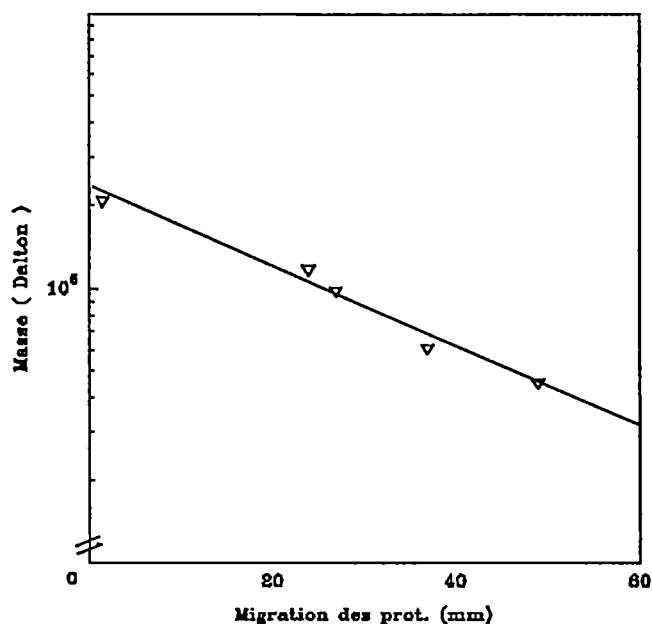


Fig 3 Calibration d'un gel d'électrophorèse 3-12 %

La figure 3 montre la migration des protéines étalons en fonction du logarithme de leurs masses moléculaires. La relation représentée est linéaire pour des masses moléculaires allant de 10 000 à 200 000 Da.

7 ANTIGÈNES ET ANTICORPS

Après une étude comparative entre plusieurs séquences peptidiques des récepteurs de la famille des sept domaines transmembranaires et les séquences peptidiques proposées par le clonage du récepteur V_1 ou V_2 de rat, cinq séquences des récepteurs d'AVP ont été choisies pour leurs caractères uniques dans la famille des protéines étudiées soit les

séquences 194 à 203 et 324 à 332 du récepteur V_1 qui correspondent respectivement à:

Ag-1: $\text{NH}_2\text{-Val-Asn-Gly-Thr-Lys-Thr-Gln-Asp-NH}_2$

Ag-2: $\text{NH}_2\text{-Asp-Phe-Ile-Trp-Thr-Asp-Ser-Glu-Asn-NH}_2$

Deux séquences sélectives pour le récepteur V_2 ont été choisies soit la position 183 à 191 et 296 à 305 qui correspondent respectivement à:

Ag-3: $\text{NH}_2\text{-Val-Gly-Asn-Gly-Ser-Gly-Val-Phe-Asp-NH}_2$

Ag-4: $\text{NH}_2\text{-Pro-Glu-Ala-Pro-Leu-Glu-Arg-Pro-Pro-NH}_2$

La séquence 5 possède une haute homologie avec le récepteur V_1 et V_2 et oxytocine soit l'Ag-5:

-Lys-

$\text{NH}_2\text{-Lys-Phe-Ile-Gln-Pro-Trp-Gly-Pro-Arg-Ala-Tyr-NH}_2$

-Thr-

Ces séquences ont été synthétisées en phase solide. La séquence 5 a été synthétisée selon le principe du mixotope de Grass-Masse (1991). De plus une $^3\text{H-Lys}$ a été insérée en position N-terminale des 5 séquences.

Ces peptides sont des haptènes i.e qu'ils ont un caractère antigénique mais ne peuvent entraîner une réaction immunitaire que s'ils sont couplés à une protéine porteuse.

7.1 Couplage des peptides aux protéines porteuses

7.1.1 Couplage des peptides sur le KLH à l'aide du DSS.

Vingt mg de KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin, Sigma) ont été dissous dans un ballon contenant 10 ml de tampon triéthanolamine/HCl 0.2 M pH 8.5. Après une heure, le peptide a été dissout dans un minimum de DMF et introduit dans le ballon dans un rapport de 4 moles de peptides pour une mole de KLH. Le réactif "bi-fonctionnel", disuccinimidyl suberate (DSS) a été introduit dans un rapport de 5 moles de DSS pour 1 mole de peptide antigénique. Après 16 heures de réaction, le mélange a été dialysé pour séparer les peptides non-liés du peptide lié au KLH comme décrit plus bas.

7.1.2 Couplage du peptide à l'ovalbumine à l'aide de la glutaraldéhyde.

Dix mg d'un peptide (± 1000 g / mole), 30 μ l de glutaraldéhyde (qualité pour microscopie électronique) et 20 mg d'ovalbumine ont été dilués dans 10 ml de tampon bicarbonate 0.2 M pH 8.4. Après 6 heures d'agitation, le mélange réactionnel a été dialysé pour séparer les peptides non-liés du peptide lié au KLH.

7.2 Dialyse

Les mélanges des réactions de couplage ont été introduits dans des sacs à dialyse (8-667E Fisher 19000 exclusion). Le sac ont été placé sous agitation dans 2 litres de tampon

carbonate/bicarbonate 0.1 N pH 8.5, NaCl 0.9 % à 4°C. A toutes les 4 heures, les tampons de dialyses ont été changés. Le deuxième tampon à dialyse était composé de 2 litres d'eau NaCl 0.45 % et NaN_3 0.02 %. La troisième, la quatrième et la cinquième dialyses ont été fait dans l'eau contenant un bactéricide soit 0.02 % d'azoture de sodium.

Avant la fermeture du sac, un échantillon de 100 μl de la solution a été pris ainsi jusqu'à la fin de la dialyse. La radioactivité de chaque fraction a été évaluée avec un compteur β . Ceci nous permet d'évaluer le nombre de moles de peptides liées aux protéines porteuses. A la fin de la dialyse, le peptide est lyophilisé avant d'être utilisé pour l'immunisation.

8. IMMUNISATION

Pour chaque type d'antigène, trois lapins ont été immunisés. Ce sont des lapins blancs de Nouvelle-Zélande d'une masse de cinq kilos. Pour immuniser une première fois les lapins, on a préparé à l'aide de seringue de verre une émulsion stable qui a été injecté dans six sites différents de manière intra-musculaire dans les pattes postérieures de l'animal. L'émulsion contient le peptides antigéniques couplés au KLH (250 μg), 250 μl d'adjuvant de Freund's complet, et 250 μl de tampon phosphate 0.1 M pH 7.4. Les rappels ont été effectués toutes les six semaines. L'émulsion a été inoculée sous-cutanée en 10 endroits sur le dos de l'animal. Dans les rappels, on utilise les mêmes concentrations de peptides dans de l'adjuvant de Freund incomplet.

8.1 Préparation du sérum

Après plusieurs immunisations (3 à 4), les premiers prélèvements sanguins peuvent être effectués. Le sang a été retiré au niveau de l'artère centrale de l'oreille avec une aiguille (21.5 G, Becton Dickinson). Le sang (40 ml) a été recueilli dans des tubes à centrifuger. Après 15 minutes de coagulation à la température ambiante, le caillot a été détaché des parois et les tubes ont été placés à 4°C. Après 12 heures, le sérum a été séparé des résidus non solubles par une centrifugation à 10000 g pendant 15 minutes. Le "surnageant" a été fractionné en aliquotes d'un ml et conservé à -20°C.

9. ESSAI D'ELISA

L'ELISA est une technique qui permet d'estimer l'affinité des anticorps pour les antigènes. Elle permet d'évaluer la quantité d'anticorps dans les sérums de lapins i.e. les titres. Le titre est défini comme l'inverse de la plus grande dilution qui produit une réaction décelable. On définit arbitrairement la réaction décelable comme l'extinction optique à 490 nm supérieure de 0.1 unité d'absorption à la valeur du bruit de fond (DAGENAIS, 1992). L'ELISA a permis de vérifier la spécificité des anticorps envers les récepteurs de la vasopressine.

9.1 Etape de liaison de l'antigène à la plaque

L'évaluation des titres et la spécificité des anticorps pour les peptides antigéniques

ont été étudiés par des essais d'ELISA. Les peptides antigéniques liés à l'ovalbumine et l'ovalbumine ont été dissous dans une concentration de 2 µg de protéine conjuguée par 100 µl de tampon carbonate/bicarbonate 0.2 M pH 9.6. Alternativement rangé par rangé; 100 µl de la solution d'antigène ont été introduit dans tout les puits d'une rangé, la rangé de puits suivante a été remplie par 100 µl d'ovalbumine (2µl/100µg) par puits. Les plaques de polystyrène (Microtiter, Dynatech Laboratories) ont été laissées pendant 16 heures à la température de la pièce avant l'étape suivante.

9.2 Saturation des sites non-spécifiques sur les parois des puits

Dans tous les puits de la plaque, 250 µl de tampon de saturation (tampon phosphate 7.5mM pH 7.4, NaCl 0.9% lait en poudre 1%) ont été ajoutés. Après deux heures d'incubation, les puits ont été lavés 2 fois avec le tampon de lavage (tampon phosphate 7.5mM pH7.4, NaCl 0.9% lait en poudre 0.2%, Tween 20 0.4%). Les plaques ont été légèrement secouées pour enlever le surplus de tampon avant d'ajouter le sérum de lapins.

9.3 Addition du sérum de lapin

Dans l'étude des titres ou de la spécificité, des dilutions de sérum de lapin: 1\100, 1\400, 1\800, 1\1600, 1\3200 ont été faites dans le tampon de saturation. Les expériences étant faites en duplicata, 100 µl de chaque dilution ont été introduits dans 2 puits contenant l'antigène et dans 2 puits contenant de l'ovalbumine. Dans le cas de l'étude

de spécificité, la série de dilution a été mise en présence d'antigène (lié à la paroi du puit) contre lesquels ils ne sont pas dirigé comme la BSA, l'anhydrase carbonique, et d'autre peptides antigéniques d'AVP. Dans le cas de l'étude de l'affinité de l'anticorps, 100 μ l d'une solution d'anticorps (1/1000) préalablement incubée avec des concentrations de 1 μ M à 1 pM ont été déposés dans chaque puits.

Après une incubation de 2 heures à température de la pièce, les plaques ont été lavées 3 fois avec le tampon de lavage avant addition de l'anti-anticorps.

9.4 Addition de l'anti-anticorps

Une solution d'anticorps anti-lapin de chèvre de type IgG et IgM conjugués à une peroxydase (EIA Grade Affinity Purified, Bio-rad) a été préparée. La dilution 1/5000 dans le tampon de saturation a été redistribuée en fraction de 100 μ l dans tous les puits de la plaque. Après l'incubation pendant 2 heures à 37°C, les plaques sont lavées 2 fois à l'aide du tampon de lavage avant de subir l'étape du développement de la coloration.

9.5 Développement de la coloration

Le réactif contenant 25 ml de tampon PBS/citrate 0.1 M pH 5, 10 mg de dichlorohydrate-o-phénylènediamine et 10 μ l de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ont été distribués en fraction de 100 μ l dans chacun des puits. Après 30 minutes d'incubation à l'obscurité, la réaction de coloration a été arrêtée à l'aide de l'ajout de 100 μ l de H_2SO_4 8N. L'intensité de la coloration développée dans les puits a été lue à 490 nm. Pour une

dilution donnée de l'anticorps, la coloration résultant de la liaison non-spécifique de l'anticorps à l'ovalbumine, a été soustraite de la coloration obtenue par la liaison des anticorps au peptide antigénique à l'ovalbumine.

La coloration ainsi évaluée nous permet d'obtenir une évaluation exacte du titre, de la spécificité ou de l'affinité des anticorps.

9.5 ETUDE DE L'AFFINITE DES ANTICORPS ENVERS LEURS ANTIGÈNES

Des études de liaisons par test d'ELISA ont été faites. Cent μ l de sérums dilués (1:1000) ont été ajoutés à des puits contenant l'antigène lié aux parois. Cent μ l des dilutions d'antigènes de concentration croissante de 10 pM à 1 mM ont été introduits dans les puits. Le blanc a été établi avec 1 μ M d'antigène et le maximum a été déterminé en absence d'antigènes libres. Les IC_{50} ont été établis pour les sérums et ont été exprimé en log négatifs de la concentration molaires.

10 BUVARDAGE DE PROTEINES

Le "Western blot" est le transfert de protéines d'un gel de polyacrylamide sur une membrane de cellulose sous l'influence d'un courant électrique. Dans l'étude, nous avons utilisé un appareil à transfert semi-sec (Bio Rad 170-3940). Le gel de polyacrylamide a été trempé dans l'eau quelques minutes après que les protéines marquées ou non de foie

et de rein ont fini de migrer. Le montage a été préparé de la façon suivante: il consiste en deux épaisseurs de papiers buvard trempés dans le tampon de transfert (Trisma base 25mM, glycine 192 mM, éthanol 20 % pH 8.3) sur lesquelles la membrane de nitrocellulose (Hybond-C, Amersham) a été déposée. La membrane a été trempée dans de l'eau lentement par capillarité. Le gel a été déposé sur la membrane et deux autres épaisseurs de papiers buvards (3 mm CHR, Whatman) ont été déposées. Certaines précautions ont été prises comme celle d'enlever toutes bulles d'air entre les feuillets ou comme celle de vérifier que toutes les tranches soient de la même dimension. Le "sandwich" a été déposé entre la cathode et l'anode de l'appareil à transfert. Un courant maximum de 25 mV a été appliqué pendant une heure.

Après transfert, le gel a été coloré au bleu de Coomassie. C'est le contrôle positif au transfert tandis que la membrane de nitrocellulose a été colorée au rouge de ponceau. Le rouge de ponceau permet de visualiser les bandes de migrations, qui ont été découpées en de longues bandelettes de 9x1 cm. La rouge de ponceau s'enlève par lavage à l'acide acétique 5 %. Cette coloration n'affecte en rien la capacité de liaison de l'anticorps sur les protéines (Harlow et Lane, 1988).

Après décoloration, les bandes ont été incubées pendant cinq minutes dans un tampon phosphate 0.1 M pH 7.5, NaCl 0.9%. La saturation des sites de liaisons non-spécifiques a été fait à l'aide d'une incubation de 15 min. des bandelettes dans un tampon de saturation (tampon phosphate 0.1 M pH 7.5, NaCl 0.9%, lait en poudre 5% (2 % de

matière grasse). Après un lavage de 5 min. dans le tampon phosphate 0.1 M pH 7.5, NaCl 0.9%, les différentes bandelettes ont été distribuées dans plusieurs petits bains pour être mises en contact avec les sérums.

Les sérums ont été dilués 1/100 dans un tampon d'incubation: phosphate 0.1 M pH 7.5, NaCl 0.9%, lait en poudre 5% (2 % de matière grasse) et ont été mis en présence de leurs bandelettes respectives. Les sérums 1 et 2 ont été mis en présence des bandelettes où il y a eu migration de protéines hépatiques tandis que les sérums 3 et 4 ont été mis en contact avec les bandelettes où les protéines rénales ont migrées. Le sérum 5 a été mis en contact avec les deux types de bandelettes. Après deux heures d'agitation, les bandelettes ont été lavées deux fois pendant 5 min. avec du tampon de lavage avant d'être exposées à l'anticorps secondaires couplés à une peroxydase (anticorps IgG et IgM de chèvre dirigé contre les anticorps de lapins) diluée 1/5000.

Après 2 heures d'incubation, les bandelettes de nitrocellulose ont subi une coloration à l'aide de la trousse de Bio-Rad: ("Horseradish peroxydase conjugate substrate kit"). La coloration a été développée à la température de la pièce. Toutes les bandelettes ont été incubées en présence de 10 ml de tampons de développement Bio-Rad, 6 µl de 4-chloro-1-naphthol dans le diéthylèneglycol et de 1 µl de peroxyde d'hydrogène. La localisation des anticorps de lapins a été détectée par l'apparition de bandes pourpres. La coloration a été arrêtée par 3 lavages à l'eau. La localisation des bandes pourpres peuvent être comparées avec celles des protéines de références dans le but d'estimer la masse des récepteurs.

11 IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE

L'étude d'immunofluorescence a été faite à partir de deux lignées cellulaires: la lignée de cellules de muscle lisse d'aorte thoracique foétal de rat (A_7R_5) qui contient les récepteurs V_1 et la lignée de cellules de l'épithélium du tubule proximal de rein humain: PT. Ces lignées cellulaires nous ont été données par le Dr. Richard Leduc et le Dr Claude Asselin. Les cellules ont été fixées à -20°C (10 min.) sur des lames à microscope à l'aide de méthanol. Trois lavages de cinq minutes dans un tampon phosphate 0.1 M pH 7.4, NaCl 0.9% ont été requis avant l'étape de saturation des sites non spécifique. L'étape de saturation consiste en une incubation de 45 min. de la lame à la température de la pièce dans une solution de blocage: tampons phosphate 0.1 M pH 7.4, BSA 2%, NaN_3 0.05%. Après l'étape de saturation, la lame a subi un lavage au tampon phosphate 0.1 M pH 7.4, NaCl 0.9% avant qu'elle soit exposée au sérum de lapin. Les cellules ont été incubées avec les sérum 2 et 4. Après 30 min. à la température de la pièce, les lames ont lavées 3 fois au tampon phosphate 0.1 M pH 7.4, NaCl 0.9%, avant d'être incubées pendant 30 min. avec l'anticorps secondaire. Après 2 lavages dans le tampon phosphate 0.1 M pH 7.5, NaCl 0.9%, les cellules fixées sur les plaques ont été colorées dans du evan blue 0.1 % pendant 30 min. Après deux lavages de 5 min. dans le tampon habituel, on a procédé au montage sur des lamelles en utilisant du PBS-glycérol (1:9), et en utilisant du paraphinylène diamine 0.1 % ce qui ralentit la dégradation de la fluorescence. La fluorescence a été observée au microscope et photographiée.

RESULTATS

1. DETERMINATION DE L’AFFINITE ET DE LA SELECTIVITE DES ANALOGUES PHOTOACTIVABLES.

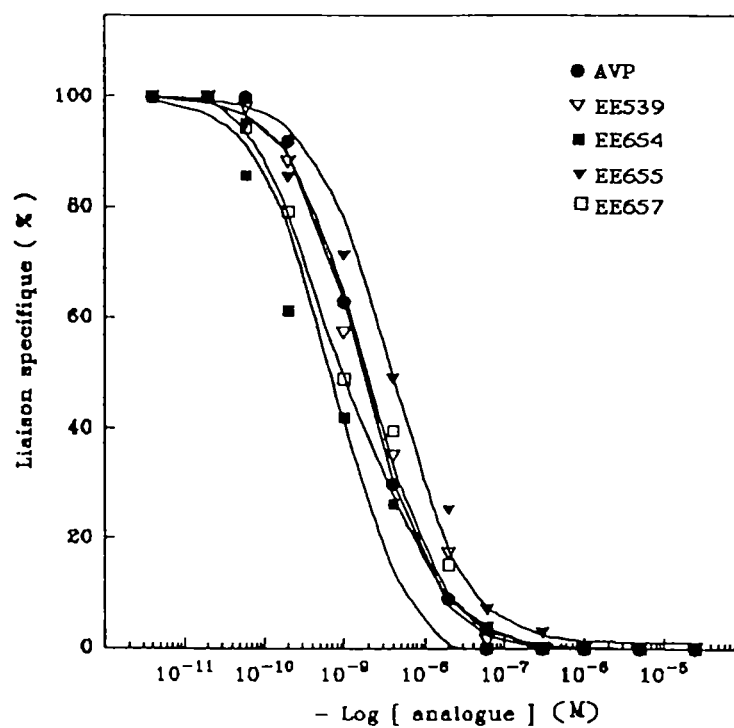
Des études de liaison ont été effectuées sur les membranes de foie et de rein de rat avec tous les analogues peptidiques synthétisés en phase solide. Les courbes de déplacements ont été établies en triplicata et chaque point de la courbe a été fait en duplicata. L’absence de liaison spécifique de l’³H-AVP sur les membranes (0 % de liaison spécifique) a été obtenue par une co-incubation de l’³H-AVP et de 1 µM d’AVP ou d’analogues peptidiques étudiés. Cependant pour plusieurs analogues, la présence d’une concentration de 10 µM a été nécessaire pour inhiber toute liaison spécifique d’³H-AVP sur les préparations membranaires. La liaison spécifique maximale de l’³H-AVP sur les préparations membranaires (100 %) a été obtenue en absence d’AVP ou des analogues peptidiques étudiés lors de l’incubation. Les courbes dose-déplacement sur les membranes de foie et de rein de rat ont été illustrées aux figures 4,5 et 6. La figure 4 regroupe les précurseurs contenant la nitrophénylalanine (EE654, EE655, EE657) et le photomarqueur contenant l’azidophénylalanine (EE539). La figure 5 regroupe les analogues contenant comme groupement photomarqueur le Bpa et la figure 6 présente les courbes de déplacements photo-marqueurs Bpa les plus sélectifs envers V₁ (EE683) ou V₂ (EE693). Sur ces figures, on a pu comparer les différentes affinités des analogues entre-eux en comparant les différents IC₅₀ (concentration d’analogue nécessaire pour inhiber 50 % de la liaison maximale d’une dose d’³H-AVP). La valeur de

l'IC₅₀ a pu être transformée en constante de dissociation (Kd) grâce à l'équation de CHENG-PRUSOFF (1978):

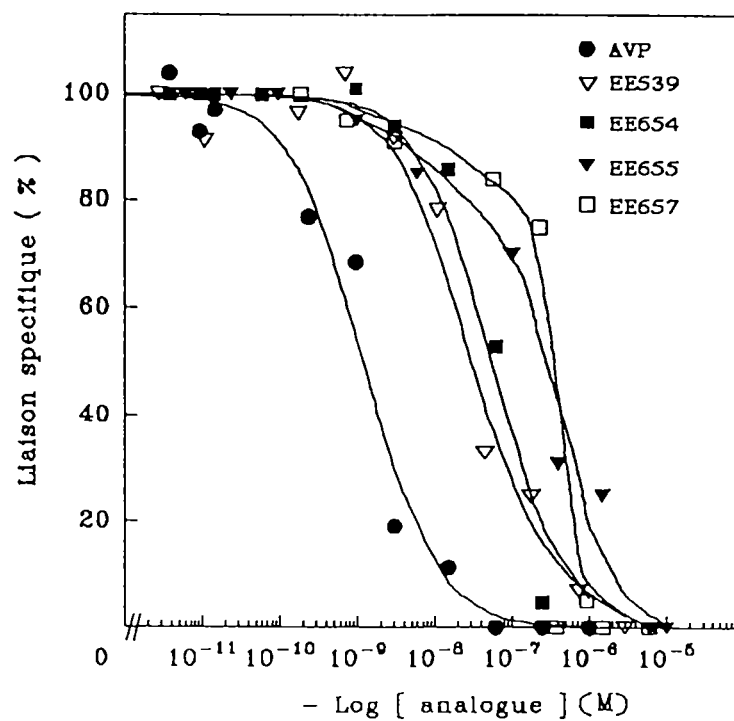
$$Kd = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[ligand]}{Kd_{[ligand]}}}$$

Les valeurs des constantes de dissociation (Kd) calculées sont regroupées dans le tableau V. On remarque que l'AVP a des valeurs de Kd sur les préparations membranaires hépatiques V₁ de 1.0 ± 0.8 nM et de 3.0 ± 2 nM sur les préparations rénales V₂. Ces deux valeurs sont relativement semblables si on tient compte de l'erreur sur ces valeurs. On a discerné deux analogues sélectifs à V₁, soit le EE539 et le EE683. Deux autres analogues ont montré une sélectivité pour le récepteur V₂, soit le EE693 et le EE717. Ces deux peptides se différencient que par un groupement carboxylique ou carboxyamide en C-terminal. Le EE684 n'a pas une grande affinité pour V₁ (343 nM) et encore moins pour V₂ (10 000 nM). Le EE692 n'a pas démontré de liaison spécifique sur les récepteurs V₁ ou V₂. Toutes les courbes de déplacements sont sigmoïdales et parallèles à la courbe de déplacement d'AVP et le déplacement du ligand (³H-AVP) par les analogues est à l'intérieur de deux unités logarithmiques de concentration.

A



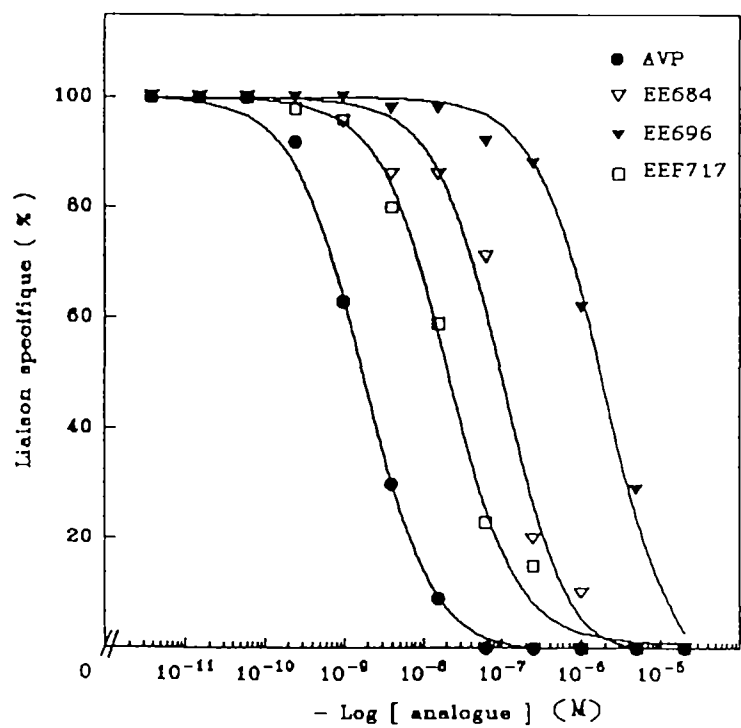
B



**FIG 4 COURBES DOSE-DEPLACEMENT DE L'³H-AVP AVEC DES ANALOGUES
CONTENANT LA NITROPHENYLALANINE OU L'AZIDOPHENYLALANINE**

Déplacement de 860 nM d'³H-AVP (foie) et de 430 nM d'³H-AVP (rein) par des doses croissantes d'analogues contenant une nitrophénylalanine ou une azidophénylalanine non-radioactifs. La partie supérieure de la figure (A) représente l'expérience sur les préparations membranaires hépatiques (50 µg), tandis que la partie inférieure (B) représente l'expérience sur la préparation membranaire rénale (500 µg). Les ordonnées et les abscisses représentent respectivement le % de liaison spécifique de l'³H-AVP et le logarithme négatif de la concentration des analogues. La liaison non-spécifique (0% de liaison spécifique) a été évaluée par la liaison de ³H-AVP en présence de 20 µM d'AVP ou d'analogues. La liaison maximale (100% de liaison spécifique) a été évaluée en présence de 4 pM d'AVP ou d'analogues. Chaque courbe est un exemple représentatif d'au moins trois expériences indépendantes effectuées en duplicata.

A



B

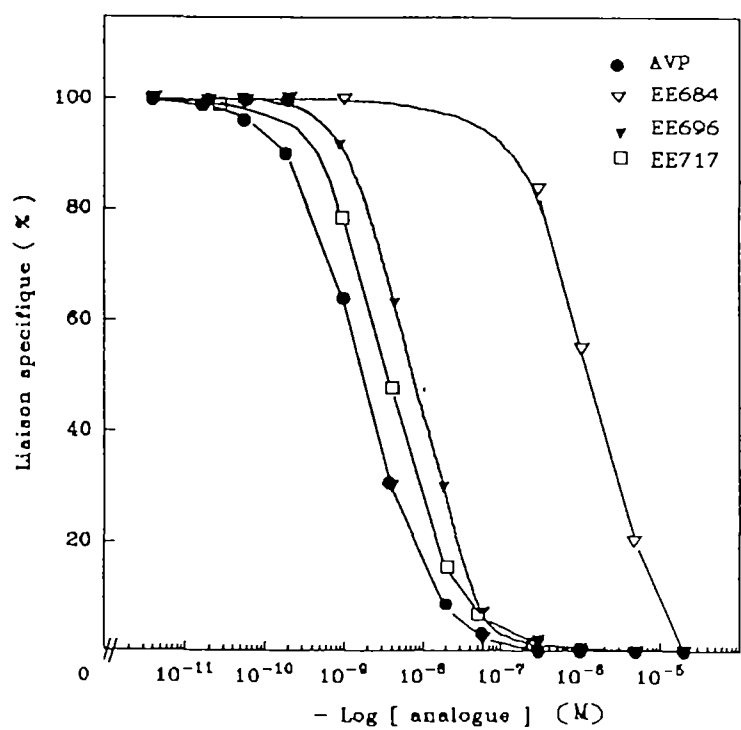
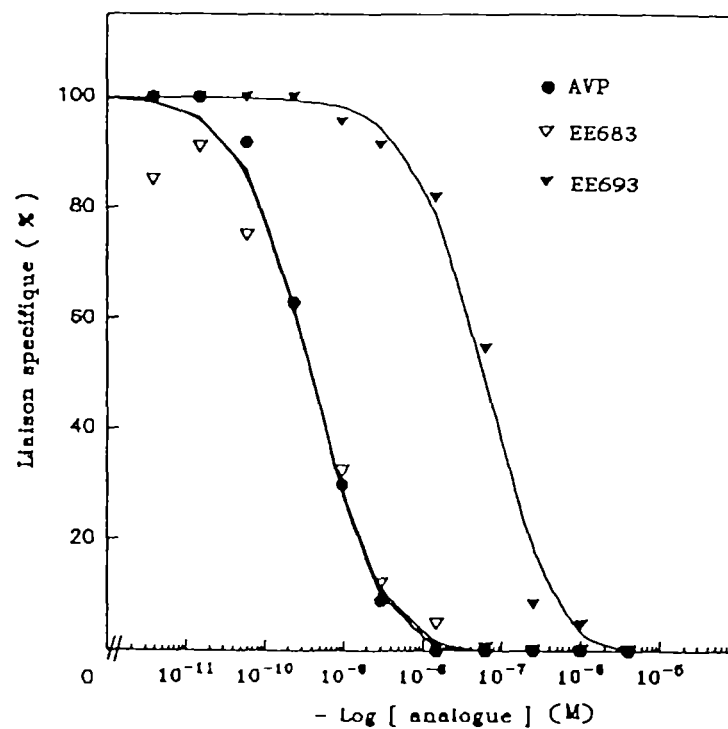


FIG 5 COURBES DOSE-DEPLACEMENT DE L'³H-AVP AVEC DES ANALOGUES D'AVP CONTENANT LE p-BENZOYLPHENYLALANINE

Déplacement de 860 nM d'³H-AVP (foie) et de 430 nM d'³H-AVP (rein) par des doses croissantes d'analogues contenant une nitrophénylalanine ou une azidophénylalanine non-radioactifs. La partie supérieure de la figure (A) représente l'expérience sur les préparations membranaires hépatiques (100 µg), tandis que la partie inférieure (B) représente l'expérience sur la préparation membranaire rénale (500 µg). Les ordonnées et les abscisses représentent respectivement le % de liaison spécifique de l'³H-AVP et le logarithme négatif de la concentration des analogues. La liaison non-spécifique (0% de liaison spécifique) a été évaluée par la liaison de ³H-AVP en présence de 20 µM d'AVP ou d'analogues. La liaison maximale (100% de liaison spécifique) a été évaluée en présence de 4 pM d'AVP ou d'analogues. Chaque courbe est un exemple représentatif d'au moins trois expériences indépendantes effectuées en duplicata.

A



B

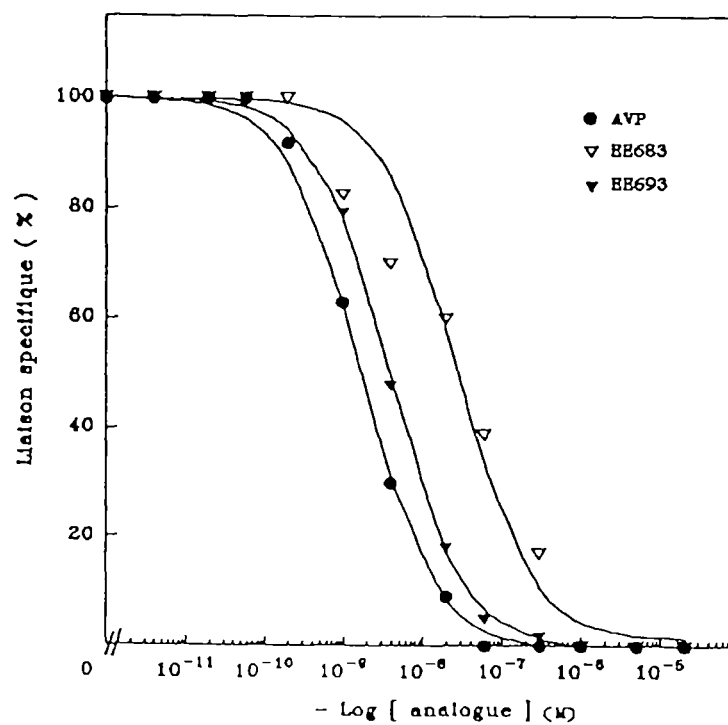


FIG 6 COURBES DOSE-DEPLACEMENT DE L'³H-AVP AVEC LES ANALOGUES
SELECTIFS: le EE683 et LE EE693

Déplacement de 860 nM d'³H-AVP (foie) et de 430 nM d'³H-AVP (rein) par des doses croissantes d'analogues contenant une nitrophénylalanine et une azidophénylalanine non-radioactifs. La partie supérieur de la figure (A) représente l'expérience sur les préparations membranaires hépatiques (100 µg), tandis que la partie inférieure (B) représente l'expérience sur la préparation membranaire rénale (500 µg). Les ordonnées et les abscisses représentent respectivement le % de liaison spécifique de l'³H-AVP et le logarithme négatif de la concentration des analogues. La liaison non-spécifique (0% de liaison spécifique) a été évaluée par la liaison de ³H-AVP en présence de 20 µM d'AVP ou d'analogues. La liaison maximale (100% de liaison spécifique) a été évaluée en présence de 4 pM d'AVP ou d'analogues. Chaque courbe est un exemple représentatif d'au moins trois expériences indépendantes effectuées en duplicata.

Tableau VI: AFFINITE ET SELECTIVITE DES ANALOGUES D'AVP

Nom des produits	#	FOIE			Rein			RATIO DE	
		Kd (nM)	pKd	Nb d'essai	Kd (nM)	pKd	Nb d'essai	SELECTIVITE V ₁ /V ₂	V ₂ /V ₁
Argine vasopressine	AVP	1.0 ± 0.8	9.00	21	3.0 ± 2.0	8.52	23	0.330	3.00
[DMPA ¹ ,Phe(NO ₂) ² ,Val ⁴ ,Lys ⁸ ,D-tyr ⁹]VP	EE 539	0.6 ± 0.1	9.22	3	350 ± 337	6.46	3	0.002	583.0
[DMPA ¹ ,Phe(NO ₂) ² ,Val ⁴ ,Lys ⁸ ,D-tyr ⁹]VP	EE 654	1.8 ± 0.6	8.74	3	109 ± 7.3	6.96	3	0.017	60.55
[DEPA ¹ ,Phe(NO ₂) ² ,Val ⁴ ,Lys ⁸ ,D-tyr ⁹]VP	EE 655	0.19 ± 0.01	9.72	3	18 ± 11	7.75	3	0.011	94.70
[DMPA ¹ ,Tyr(OEt) ² ,Val ⁴ ,Lys ⁸ ,D-tyr ⁹]VP	EE 657	0.18 ± 0.08	9.74	3	170 ± 29	6.77	3	0.001	944.0
[DMPA ¹ ,Bpa ² ,Val ⁴ ,Lys ⁸ ,D-tyr ⁹]VP	EE 683	2.00 ± 0.40	8.70	8	293 ± 189	6.53	4	0.007	146.5
[DMPA ¹ ,Tyr ² ,Bpa ³ ,Val ⁴ ,Lys ⁸ ,D-tyr ⁹]VP	EE 684	343 ± 107	6.47	3	10 000	> 5	6	---	---
[DMPA ¹ ,D-bpa ² ,Phe(NO ₂) ³ ,Ile ⁴ ,desGly ⁹]VP	EE 692	10 000	> 5	3	10 000	> 5	3	---	---
[CPA ¹ ,D-bpa ² ,Phe(NO ₂) ³ ,Ile ⁴ ,Arg-NH ₂ ⁸ ,desGly ⁹]VP	EE 693	246 ± 87	6.61	9	3.0 ± 1.0	8.30	5	49.0	0.020
[CPA ¹ ,D-Ile ² ,Phe(NO ₂) ³ ,Ile ⁴ ,Bpa ⁹]VP	EE 696	1618 ± 401	5.79	5	135 ± 130	6.87	3	11.9	0.083
[CPA ¹ ,D-bpa ² ,Phe(NO ₂) ³ ,Ile ⁴ ,Arg-OH ⁸ ,desGly ⁹]VP	EE 717	20.0 ± 9.0	8.0	3	3.0 ± 0.5	8.22	3	6.67	0.150

DMPA: β,β-diméthyl-β-mercaptopropionyl, DEPA: β,β-diéthyl-β-mercaptopropionyl, CPA: β,β-cyclopentaméthylène-β-mercaptopropionyl,

2 IODATION DES ANALOGUES PEPTIDIQUES PHOTO-ACTIVABLES

L'iodation a été fait sur trois peptides: le EE539, le EE683 et le EE693. Après l'iodation, les peptides (le ^{125}I -EE539, le ^{125}I -EE683 ou le ^{125}I -EE693) ont été séparés des peptides non iodés et de l' ^{125}I à l'aide d'une purification sur HPLC. Le profil d'élution de ces produits iodés est illustré aux figures 7 et 8.

Les peptides iodés par la méthode à l'Iodo-Gen (le ^{125}I -EE539 et le ^{125}I -EE683) ont élués de la colonne d'HPLC à une concentration d'acétonitrile aqueux de 60 % et 80 % respectivement. Le rendement de marquage de ces peptides se situe respectivement aux environs de 60 % et 28 %. Le peptide iodé par la méthode de Gatterman-Sandmeyer (^{125}I -EE693) a élué avec 82 % d'acétonitrile et un rendement d'iodation de 10 %. L'activité spécifique de ces produits a été évaluée pour le ^{125}I -EE539 à 1199 Ci/mmole, pour le ^{125}I -EE683:[β - β -dimethyl- β -mercaptopropionyl¹,Bpa²,Val⁴, Lys⁸,D-tyr⁹]VP à 1305 \pm 157 Ci/mmole et pour le ^{125}I -[β - β -cyclopentamethylene- β -mercaptopropionyl¹,D-Bpa²,Phe³,Ile⁴, Arg⁸, desGly⁹]VP à 750 Ci/mmole.

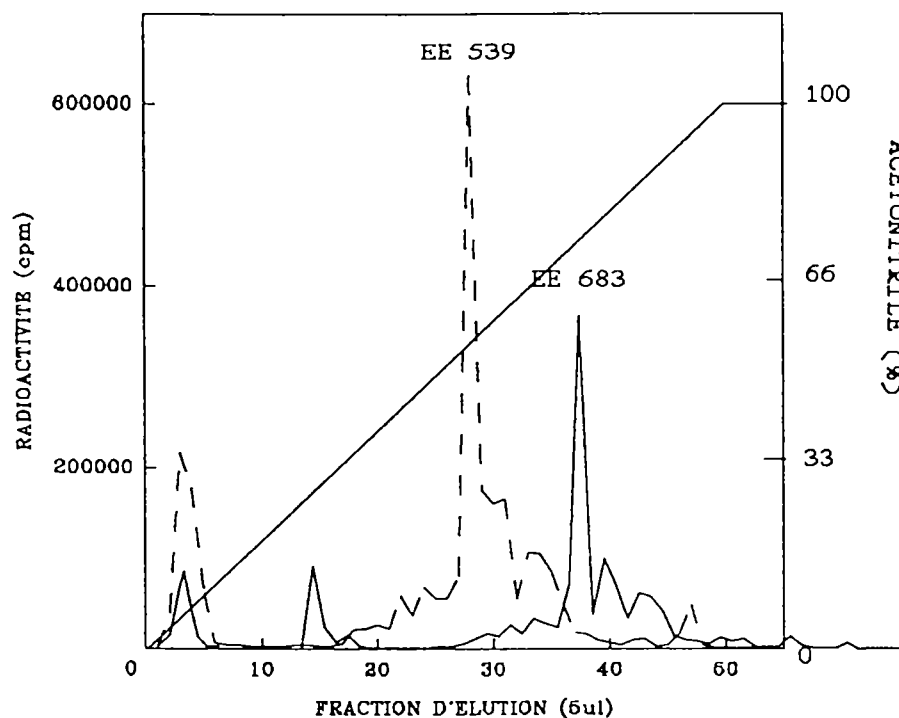


FIG 7 PROFIL D'ELUTION SUR COLONNE C-18 D'HPLC DES ANALOGUES

^{125}I -EE539 ET ^{125}I -EE683

La purification des radioligands sur une colonne HPLC C-18 a été faite à l'aide de 50 ml d'un gradient de 0% à 100% acétonitrile et TFA 0.1%. L'éluat a été recueilli en fraction de 1 ml d'où 5 μl de chaque fraction furent mesurées par comptage gamma. La radioactivité de chacune des fractions a été mise sous forme graphique ainsi que le gradient d'élution.

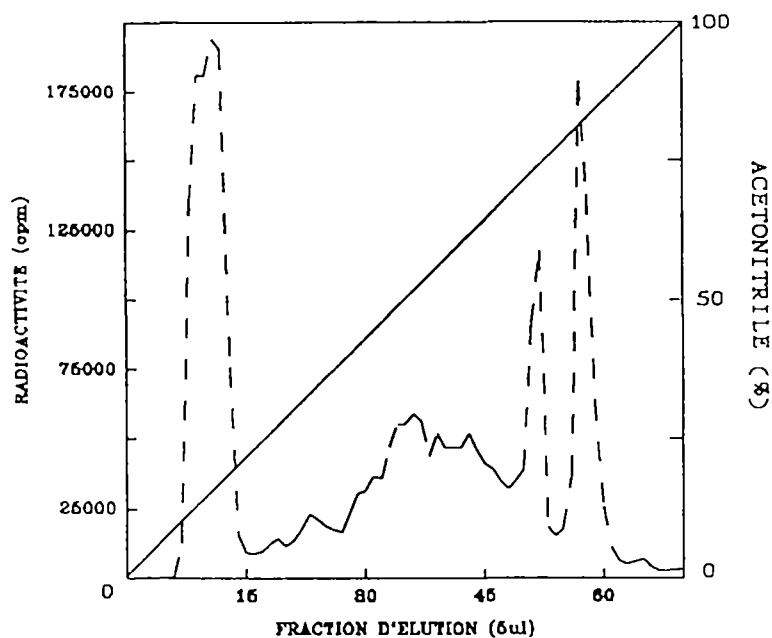


FIG 8 PROFIL D' ELUTION SUR COLONNE C-18 D'HPLC DE ^{125}I -EE693

La purification des radioligands sur une colonne HPLC C-18 a été faite à l'aide de 70 ml d'un gradient de 0% à 100% acétonitrile et TFA 0.1%. L'éluat a été recueilli en fraction de 1 ml d'où 5 µl de chaque fraction furent mesurées en comptage gamma. La radioactivité de chacune de ces fractions a été mise sous forme graphique ainsi que le gradient d'élution.

3. DETERMINATION DE L’AFFINITE DES ANALOGUES RADIO-MARQUES

Des courbes de dose-déplacement des radiotraceurs et de l’³H-AVP par l’AVP ont été effectuées. Les pentes des courbes de déplacement de nos radio-ligands sont parallèles à la pente de la courbe de l’³H-AVP. L’écart entre la valeur de l’IC₅₀ des photomarqueurs et celles obtenues lorsqu’ils sont iodés montre qu’ils ont sensiblement la même affinité envers leurs récepteurs respectifs (fig 9,11,13).

L’affinité des analogues radio-marqueurs a été évaluée suite à des expériences de liaison et la liaison spécifique des photomarqueurs est représentée sous graphique de Scatchard. Chacun des points de la représentation de Scatchard a été fait en triplicata. Les valeurs expérimentales des points varient de moins de 10% autour de la valeur moyenne.

Les figures 10,12,14 représentent les graphiques de Scatchard sur les membranes de foie contenant le récepteur V₁, de rein de rat contenant les récepteur V₂ et des préparations de membranes plaquettaires humaines contenant le récepteur V₁. Chacune des droites est indépendantes l’une de l’autre. Les représentations de Scatchards ont été tracées à partir d’un calcul de régression linéaire, le coefficient de régression a été de 0.80. Sur ces droites, l’inverse de la pente nous donne les Kds. Les valeurs des affinités (Kd) calculées de tous les ligands étudiés sont illustrées au tableau VII.

Tableau VII AFFINITES DES ANALOGUES PHOTSENSIBLES RADIO-IODES D'AVP

no.	structure	Kd (nM)	pKd	N	Préparation membranaire de
¹²⁵ I-EE539	[DMPA ¹ ,Phe(N ₃) ² ,Val ⁴ ,Lys ⁸ ,D-tyr(I) ⁹]VP	0.48 ± 0.19	9.32	7	FOIE
¹²⁵ I-EE539	[DMPA ¹ ,Phe(N ₃) ² ,Val ⁴ ,Lys ⁸ ,D-tyr(I) ⁹]VP	1.02*	8.99	1	Plaquettes non-purifiées
¹²⁵ I-EE539	[DMPA ¹ ,Phe(N ₃) ² ,Val ⁴ ,Lys ⁸ ,D-tyr(I) ⁹]VP	0.72*	9.14	1	Plaquettes purifiées
¹²⁵ I-EE683	[DMPA ¹ ,Bpa ² ,Val ⁴ ,His ⁸ ,D-tyr(I) ⁹]VP	1.37 ± 0.19	8.86	4	FOIE
¹²⁵ I-EE683	[DMPA ¹ ,Bpa ² ,Val ⁴ ,His ⁸ ,D-tyr(I) ⁹]VP	0.27 ± 0.10*	9.56	3	Plaquettes non-purifiées
¹²⁵ I-EE683	[DMPA ¹ ,Bpa ² ,Val ⁴ ,His ⁸ ,D-tyr(I) ⁹]VP	0.56*	9.25	1	Plaquettes purifiées
¹²⁵ I-EE693	[CPA ¹ ,D-Bpa ² ,Phe(I) ³ ,Ile ⁴ ,desGly ⁹]VP	0.91	9.04	1	REIN

DMPA: β,β-diméthyl-β-mercaptopropionyl, CPA: β,β-cyclopentaméthylène-β-mercaptopropionyl, Bpa: p-Benzoylphenylalanine

4. CARACTERISATION DES PREPARATIONS MEMBRANAIRES

Pour cette fin, des analogues sélectifs et radiomarqués ont été déplacés de leur site de liaison respectifs par l'AVP. Un graphique de Scatchard où l'analogue sélectif à V_1 ou V_2 radiomarqué a été déplacé de ses sites de liaisons sur les préparations membranaires par l'AVP. Des études de déplacements ont été faites sur des préparations de foie (V_1) et de reins (V_2) de rat ainsi que sur des préparations de membranes plaquettaires humaines (V_1) purifiées ou non (dite brutes). Les représentations de ces courbes de déplacement sous forme de Scatchard évaluent le nombre maximal de sites spécifiques sur ces préparations membranaires. L'intersection de la courbe sur l'abscisse représente le nombre de sites de liaison maximale de l'analogue sur la préparation membranaire (Scatchard, 1949). La valeur à l'abscisse de cette intercepte a été évaluée à partir de régressions linéaires et toutes les droites avaient un coefficient de corrélation de 0.75 et plus.

La représentation de Scatchard de la figure 10 illustre des nombres de sites de liaisons maximales sur les membranes hépatiques, 1.02 ± 0.15 pmol de site par mg de protéines et 0.41 ± 0.25 pmol par mg de protéines a été évalué à l'aide du ^{125}I -EE539 (n=7) et du ^{125}I -EE683 (n=5) respectivement.

La représentation d'une étude préliminaire sous forme de Scatchard (Fig 12) illustre un nombre de sites de liaisons maximales sur les membranes rénales de 0.004 pmol par mg de protéines avec le ^{125}I -EE693 (n=1) comme traceur. La représentation de Scatchard

d'une expérience identique avec l'³H-AVP comme traceur démontre 0.004 pmol de sites par mg de protéines rénales.

La troisième préparation a été reçue de Cleveland (Thibonnier, Case Western Reserve University) sur une forme purifiée (gradient de sucrose) ou non purifiée (dite brute). La représentation de Scatchard d'une expérience avec le ¹²⁵I-EE539 comme ligand (Fig 14) montre qu'il y aurait 0.008 pmol de sites par mg de protéines de la préparation brute. Un nombre semblable de 0.018 ± 0.008 pmol par mg de protéines a été évalué sur ces mêmes préparations brutes à l'aide du traceur ¹²⁵I-EE683 (n=5). Des quantités semblables de 0.0038 et de 0.0083 pmol ont été identifiées respectivement lors de l'utilisation de ces deux même radiotraceurs sur les membranes de plaquettes sanguines purifiées (Fig 14).

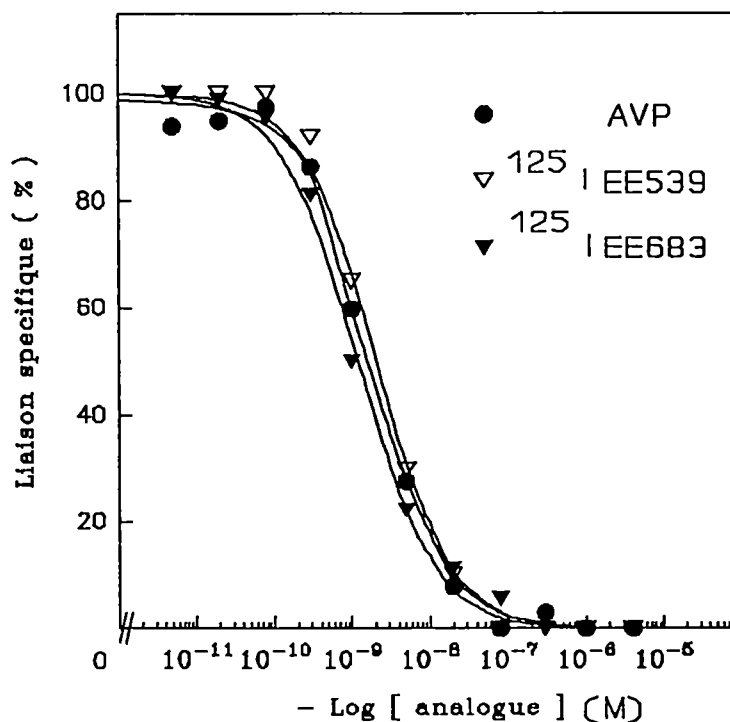


FIG 9 COURBES DOSE-DEPLACEMENT DE ^3H -AVP, ^{125}I -EE539 ET ^{125}I -EE683 PAR L'AVP SUR UNE PREPARATION MEMBRANAIRE DE FOIE

Les courbes de doses-déplacements ont été faites en présence de 1 nM de ^{125}I -EE539 ou de ^{125}I -EE683 ou de ^3H -AVP. Les peptides radioactifs ont été déplacés par des concentrations croissantes de 5 pM à 4 μM d'AVP. Les ordonnées et les abscisses représentent respectivement le % de liaison spécifique des peptides radioactifs et le logarithme négative de la concentration d'AVP. La liaison non-spécifique (la liaison du radiotraceur sur un autre endroit que le récepteur) a été évaluée par la liaison de ^3H -AVP en présence de 20 μM d'AVP ou d'analogues. La liaison maximale (100% de liaison spécifique) a été évaluée en présence de 4 pM d'AVP ou d'analogues. Chaque courbe est un exemple représentatif d'au moins trois expériences indépendantes effectuées en duplicata.

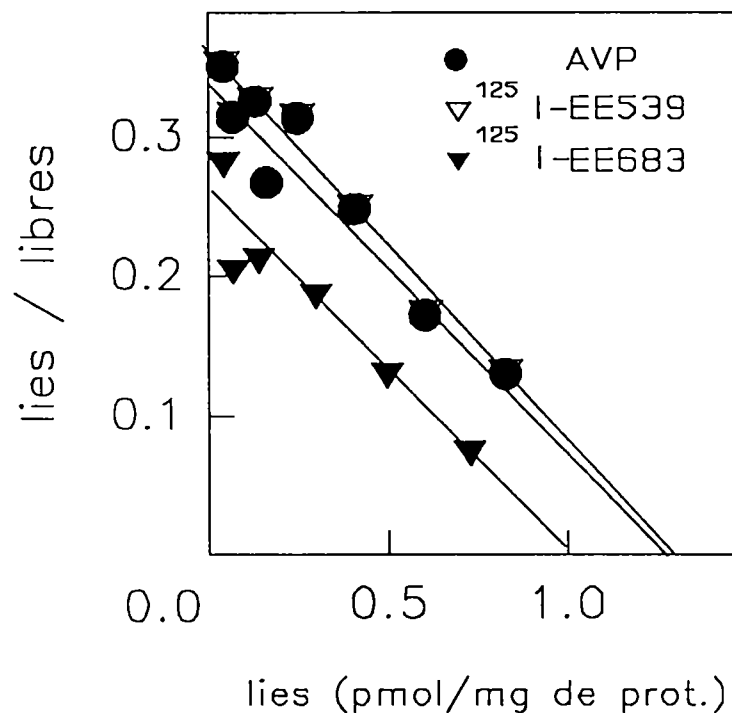


Fig 10 REPRESENTATION DE SCATCHARD DES COURBES DE SATURATION DES SITES V_1 SUR UNE PREPARATION MEMBRANAIRE HEPATIQUE PAR ^3H -AVP, ^{125}I -EE539 ET ^{125}I -EE683

La liaison spécifique de l'étude de saturation des sites V_1 à l'aide des peptides radioactifs a été représentée sous forme de Scatchard. La liaison spécifique d'un peptide radioactif a été déterminée comme étant la différence entre la liaison totale obtenue en présence d'une concentration de peptide radioactif et la liaison non-spécifique. La liaison non-spécifique a été déterminée en présence de $1 \mu\text{M}$ d' AVP. Chacun des points expérimentaux a été fait en triplicata. Dans tous les cas, le coefficient de corrélation linéaire (r) est plus grand que 0.80.

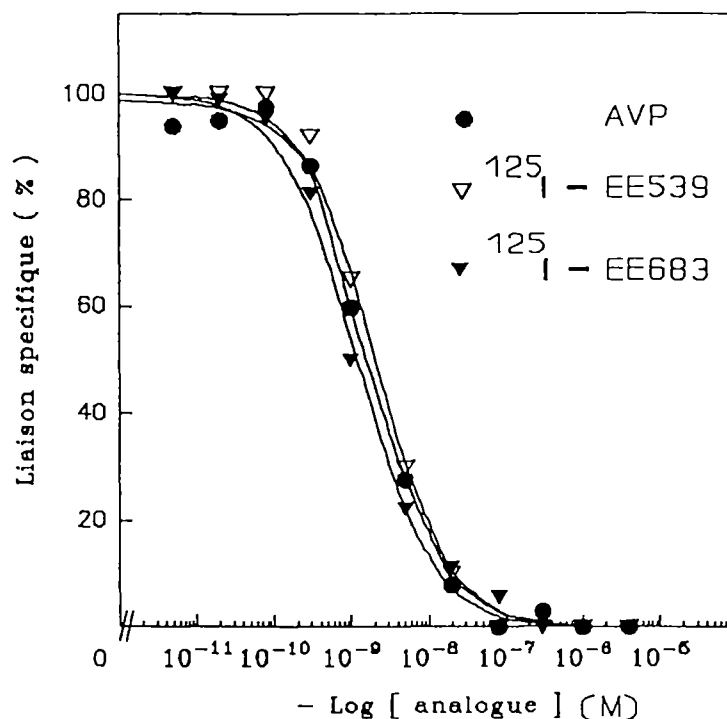


FIG 11 COURBES DOSE-DEPLACEMENT DU ³H-AVP ET ¹²⁵I-EE693 PAR L'AVP
SUR UNE PREPARATION MEMBRANAIRE DE REIN.

Les courbes de doses-déplacements ont été faites en présence de 1 nM de ¹²⁵I-EE693 ou de ³H-AVP. Les peptides radioactifs ont été déplacés par des concentrations croissantes de 5 pM à 4 μM d'AVP. Les ordonnées et les abscisses représentent respectivement le pourcentage de liaison spécifique des peptides radioactifs et le logarithme négative de la concentration d'AVP. La liaison non-spécifique (la liaison du radiotraceur sur un autre endroit que le récepteur) a été évaluée par la liaison de ³H-AVP en présence de 20 μM d'AVP ou d'analogues. La liaison maximale (100% de liaison spécifique) a été évaluée en présence de 4 pM d'AVP ou d'analogues. Chaque courbe est un exemple représentatif d'au moins trois expériences indépendantes effectuées en duplicata.

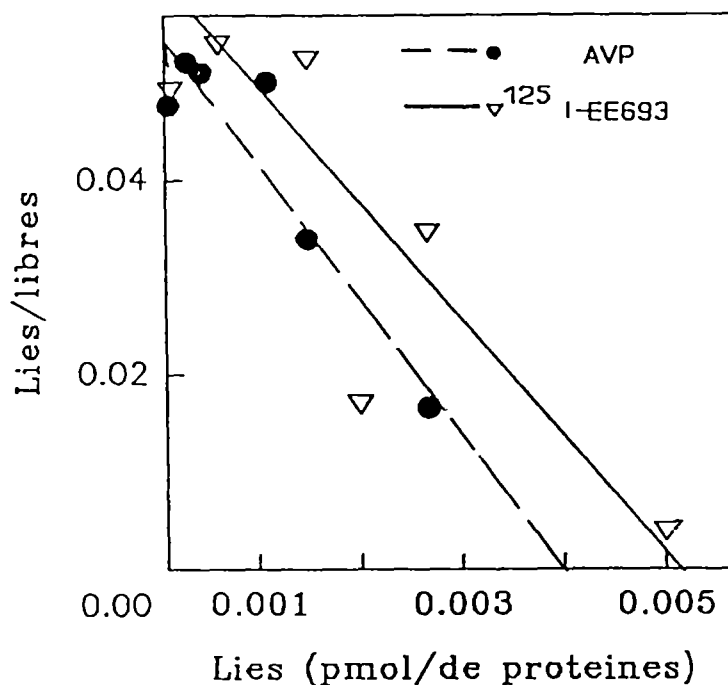
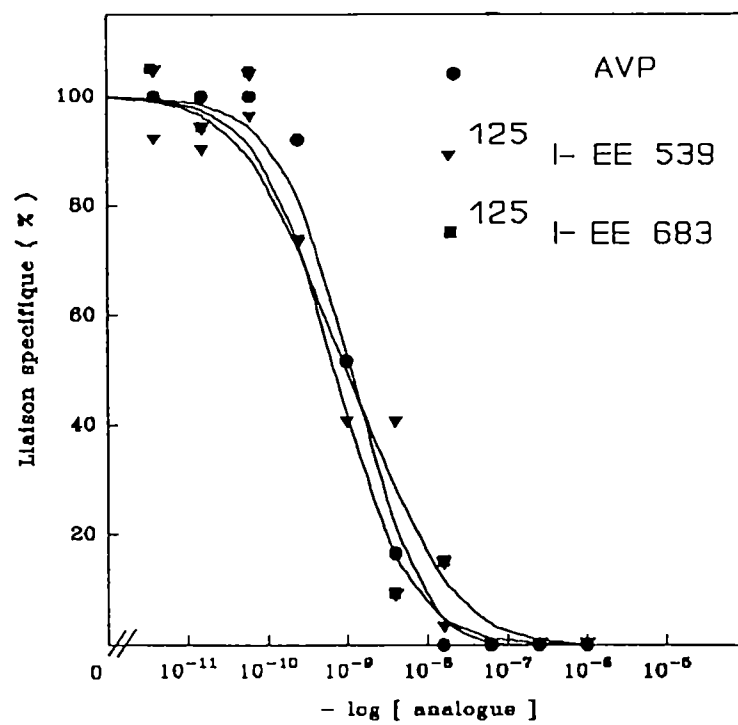


Fig 12 REPRESENTATION DE SCATCHARD DES COURBES DE SATURATION
DES SITES V_2 SUR UNE PREPARATION MEMBRANAIRE RENALE PAR
 ^3H -AVP ET ^{125}I -EE693

La liaison spécifique de l'étude de saturation des sites V_1 à l'aide des peptides radioactifs a été représentée sous de graphique de Scatchard. La liaison spécifique d'un peptide radioactifs a été déterminée comme étant la différence entre la liaison totale obtenue en présence d'une concentration de radio-ligand et la liaison non-spécifique. La liaison non-spécifique a été déterminé en présence de $1\ \mu\text{M}$ d' AVP. Chacun des points expérimentaux a été fait en triplicata. Dans tous les cas, le coefficient de corrélation linéaire (r) est plus grand que 0.80.

A



B

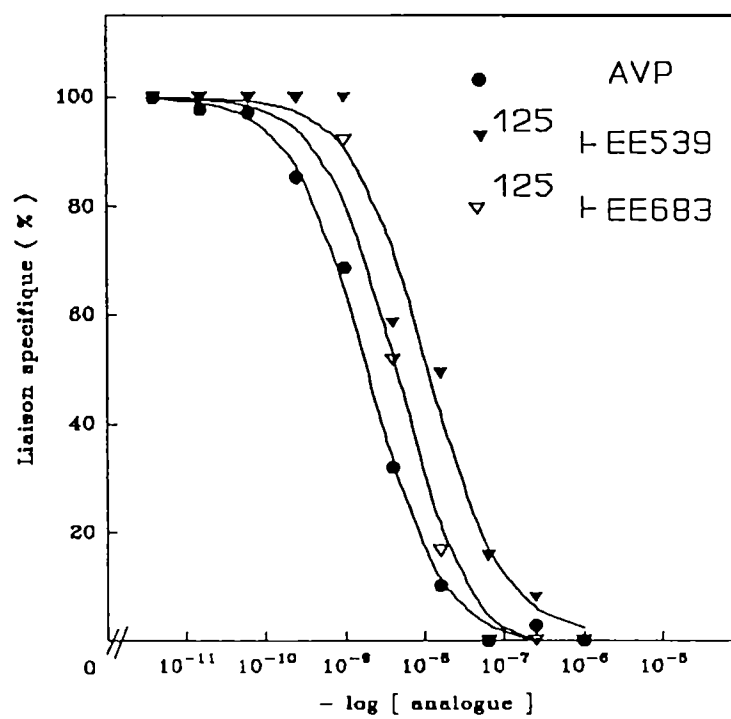
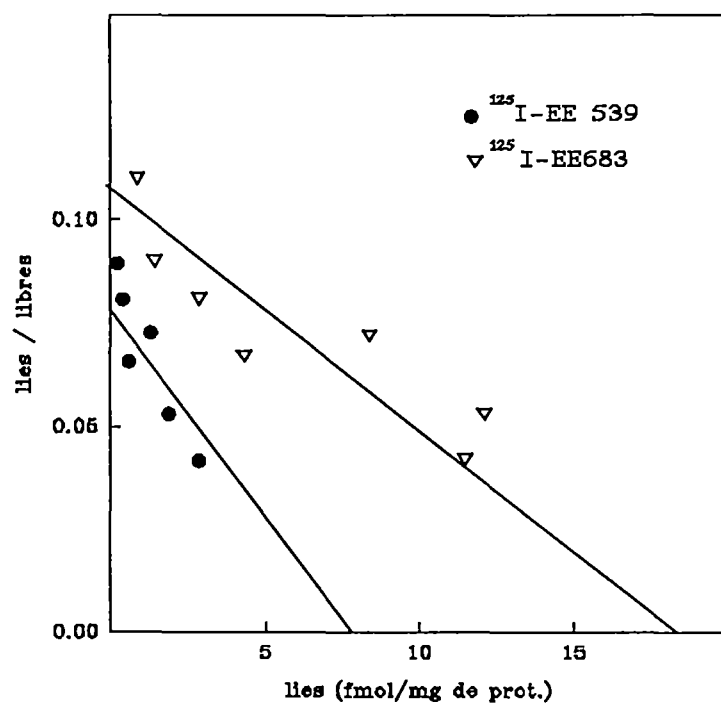


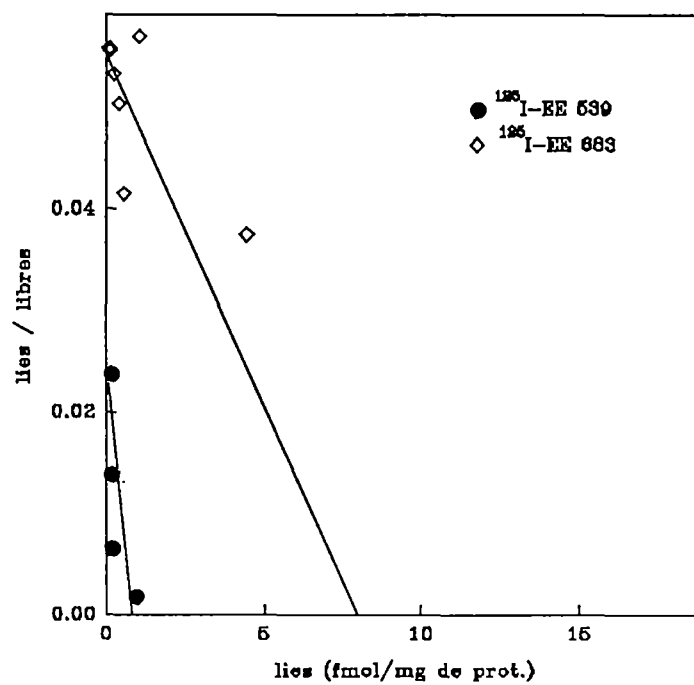
FIG 13 COURBES DOSE-DEPLACEMENT DE ^3H -AVP, DE ^{125}I -EE539 ET DE ^{125}I -EE683 PAR L'AVP SUR UNE PREPARATION DE MEMBRANAIRE DE PLAQUETTES PURIFIEES ET NON PURIFIEES

Les courbes de doses-déplacements ont été faites en présence de 1 nM de ^{125}I -EE539 ou de ^{125}I -EE683 ou de ^3H -AVP. Les peptides radioactifs ont été déplacés par des concentrations croissantes de 5 pM à 4 μM d'AVP. Les ordonnées et les abscisses représentent respectivement le pourcentage de liaison spécifique des peptides radioactifs et le logarithme négative de la concentration d'AVP. La liaison non-spécifique (la liaison du radiotraceur sur un autre endroit que le récepteur) a été évaluée par la liaison de ^3H -AVP en présence de 20 μM d'AVP ou d'analogues. La liaison maximale (100% de liaison spécifique) a été évaluée en présence de 4 pM d'AVP ou d'analogues. Chaque courbe est un exemple représentatif d'au moins trois expériences indépendantes effectuées en duplicata.

A



B



**Fig 14 REPRESENTATION DE SCATCHARD DES COURBES DE SATURATION
DES SITES V_1 SUR UNE PREPARATION MEMBRANAIRE DE PLAQUETTES
PURIFIEES OU NON-PURIFIEES PAR ^3H -AVP, ^{125}I -EE683 ET ^{125}I -EE539**

La liaison spécifique de l'étude de saturation des sites V_1 à l'aide des peptides radioactifs a été représentée sous forme de Scatchard. La liaison spécifique d'un peptide radioactif a été déterminée comme étant la différence entre la liaison totale obtenue en présence d'une concentration de radio-ligand et la liaison non-spécifique. La liaison non-spécifique a été déterminé en présence de 1 μM d' AVP. Chacun des points expérimentaux a été fais en triplicata. Dans tous les cas, le coefficient de corrélation linéaire (r) calculé par ordinateur avec un degré de liberté respectivement de 7,6,6,4 est environs de 0.75

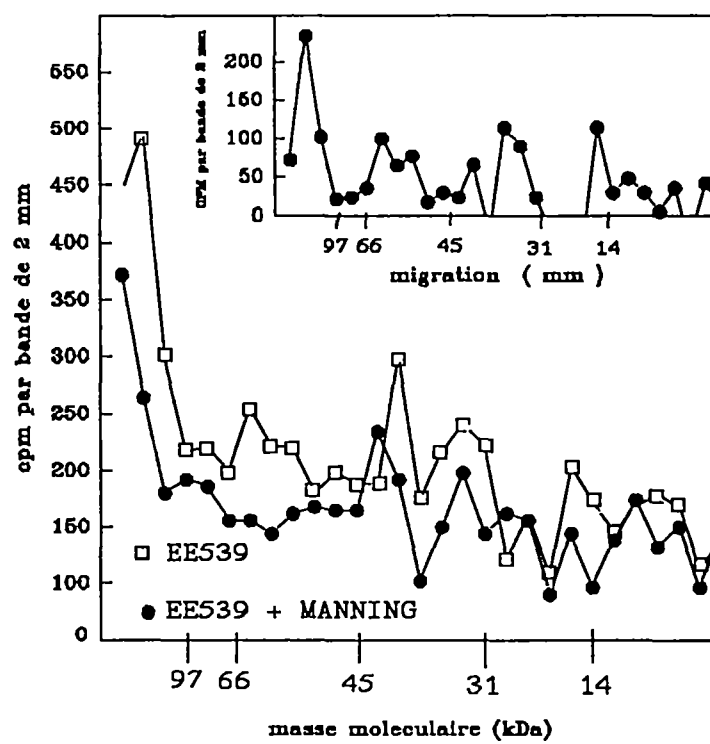
5 PHOTOMARQUAGES DES RECEPTEURS V_{1A} HEPATIQUES ET V_1 PLAQUETTAIRES

Les membranes hépatiques de rat photomarquées ont été analysées par migration sur gel d'électrophorèse 3-12% SDS-polyacrylamide. Les gels séchés ont été découpés en bandes de 2x10 mm. Le contenu radioactif de ces bandelettes a été évalué et représenté sous forme graphique où l'intensité du signal est placée en ordonnée et la masse moléculaire en abscisse. En médaillon, on a illustré l'intensité du signal spécifique de chaque bande soit l'intensité à laquelle le bruit de fond a été soustrait. Ces profils de migration sont présentés aux figures 15-16-17-18. Cette méthode de représentation a été favorisée par rapport à la méthode d'autoradiographie car elle permet d'éliminer les délais d'exposition de 3 semaines. La figure 15 illustre en A et B respectivement, un exemple d'une migrations des protéines membranaires hépatiques photomarquées à l'aide de 1 nM de ^{125}I -EE539 en absence ou en présence de 1 μM de compétiteur réversible soit le composé de Manning ou l'AVP et un exemple de la migration des protéines déglycosylées ou non qui ont été photomarquées à l'aide de 1nM de ^{125}I -EE539. A la figure 15A, on observe des pics à 120, 57.7 ± 7.6 , 42.9 ± 2.1 , 32.5 ± 2.5 kDa (n=22). Dans le cas de la migration des protéines déglycosylées (15B), on observe des pics à 160, 88, 45.5 ± 2.7 (n=8), 38 kDa. La figure 16 illustre les même paramètres étudiés à la figure 15 sauf que le photomarqueur est le ^{125}I -EE683. Dans la figure 16A, on observe des pics à 120, 85, 56.2 ± 5.03 (n=8) et à 14 kDa. Dans la migration des protéines déglycosylées (fig 16B), on remarque des pics à 200, 97, 43.4 ± 2.7 kDa (n=5) et 32 kDa. L'intensité du signal radioactif observée à la figure 16 est plus élevée que celle observée à la figure 15.

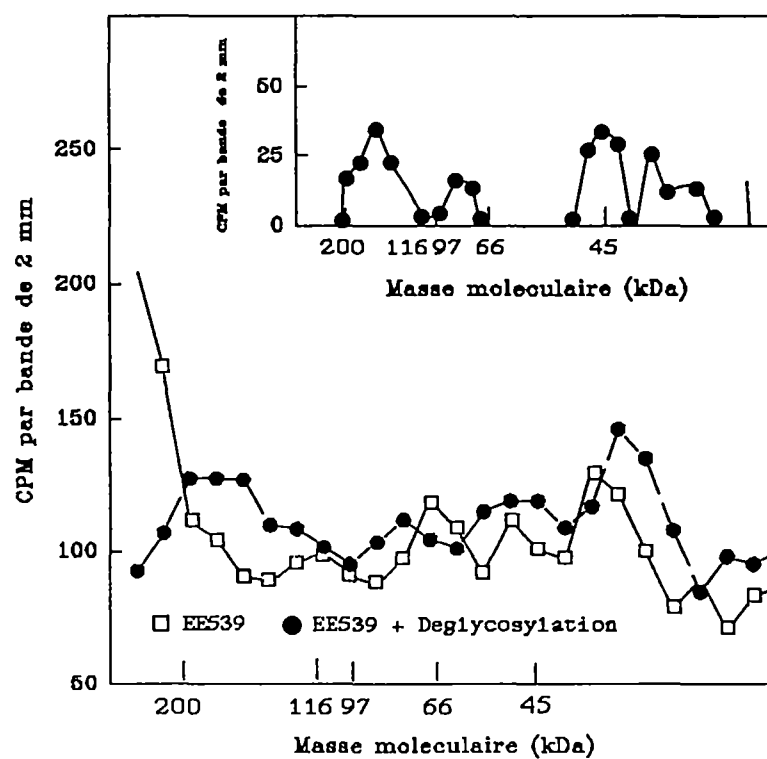
Le maximum de rendement d'étiquetage des analogues d'AVP dans les récepteurs V_1 a été obtenu après 20 minutes d'irradiation sous U.V.. Le rendement d'étiquetage du ^{125}I -EE539 a été évalué à $2.0 \pm 0.8 \%$ ($n=21$) tandis que le ^{125}I -EE683 photomarque avec un rendement de $28.5 \pm 3.9 \%$ ($n=19$). Une irradiation prolongée a amené une diminution du photomarquage de l'analogue ^{125}I -EE683 dans les récepteurs V_1 des préparations hépatiques de rat: le rendement de photomarquage a diminué à 3.1% après six heures d'irradiation. Les figures 17 et 18 illustrent la migration de protéine provenant de membranes plaquettaires purifiées sur sucrose ou non. A la figure 17, on a illustré deux exemples soit: la migration des protéines provenant des membranes plaquettaires purifiées photomarkées à l'aide du ^{125}I -EE539 (A) ou à l'aide du ^{125}I -EE683 (B). Lors de l'étude avec le premier photomarqueur (A), on observe des pics à 200, 81, 60, 46 kDa. Tandis que l'utilisation du photomarqueur ^{125}I -EE683 (B), on observe des pics à 182, 140, 62, 56, 41 kDa. Les préparations de protéines provenant des membranes de plaquettes non-purifiées sur sucrose ont aussi été photomarkées à l'aide du ^{125}I -EE539 et du ^{125}I -EE683 (fig 18). Cependant, aucun signal significatif n'a été obtenu à l'aide du premier photomarqueur, le ^{125}I -EE539, tandis que l'utilisation du ^{125}I -EE683 a permis d'observer un pic vers 60 kDa (Fig 18). On remarque aussi que l'intensité du signal de photomarquage sur les préparations membranaires de plaquettes sanguines est plus basse ($\pm 30\text{cpm}$) que l'intensité du signal de photomarquage des membranes hépatiques de rats ($\pm 6000\text{cpm}$: ^{125}I -EE683, 300cpm : ^{125}I -EE539).

La figure 19 présente l'autoradiographie d'un gel SDS-Page 3-12% après migration de protéines hépatiques photomarquées à l'aide du radiotracer ^{125}I -EE683 (couloir A) et une migration de protéines hépatiques photomarquées en présence de 1 μM d'analogue compétiteur (composé de Manning) (couloir B). Après 3 semaines d'exposition, l'autoradiographie montre la présence de 3 faibles taches dans la bande A soit à 160, à 60, à 43 kDa. Dans la bande B où la seule différence a été que les photomarqueurs ont été mis en compétition pour les sites de liaison d'AVP par un analogue, les taches de 160, 60 et 43 kDa semblent diminuer d'intensité.

A



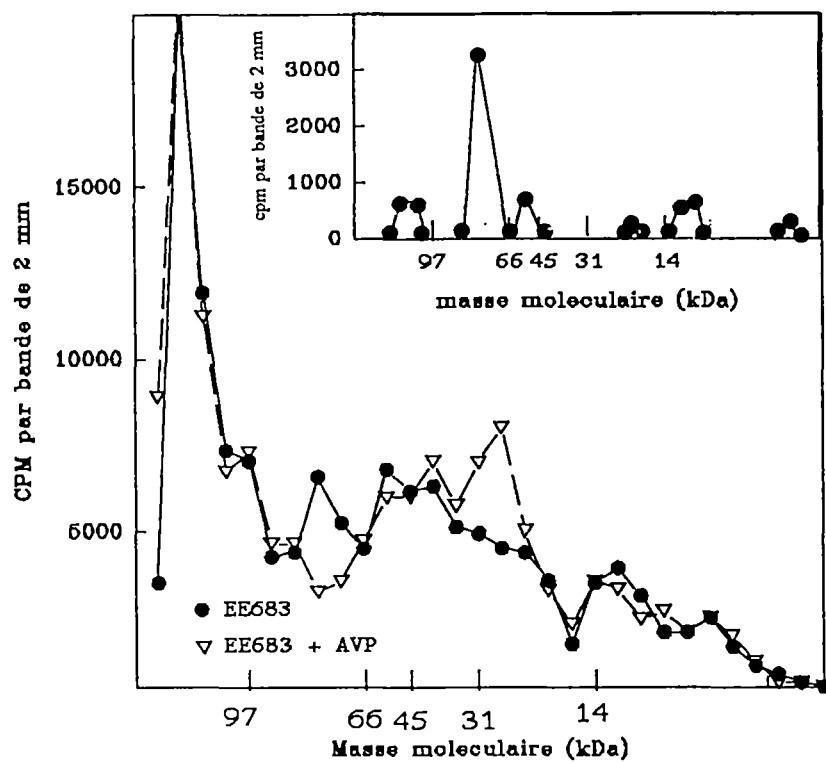
B



**FIG 15 MIGRATION SUR SDS-PAGE 3-12 % DES PROTEINES HEPATIQUES
PHOTOMARQUEES EN PRESENCE DE ^{125}I -EE539**

Profil de radioactivité d'un gel de polyacrylamide 3-12% après migration de 50 μg de protéines hépatiques photomarkées en présence de 1 nM d' ^{125}I -EE539. En A, des membranes ont été incubées en présence ou en absence de 1 μM d'antagoniste sélectif V_1 (composé de Manning) avant l'irradiation des membranes. En B, les membranes ont subi ou non une déglycosylation de 24 heures en présence de 3 unités d'endoglycosidase F après le photomarkage. Après migration, les gels ont été découpés en bandelettes de 2x10 mm et leur contenu en radioactivité a été mesuré. Ces données sont représentées sous forme graphique. En médaillon, on présente le contenu en cpm des bandes où est soustrait le bruit de fond. Les standards de masses moléculaires pour A et B sont: myosine (200 kDa), β -galactosidase (116.3 kDa), phosphorylase b (97.2 kDa), BSA (66.2 kDa), ovalbumine (45.0 kDa), anhydrase carbonique bovine (31.0 kDa).

A



B

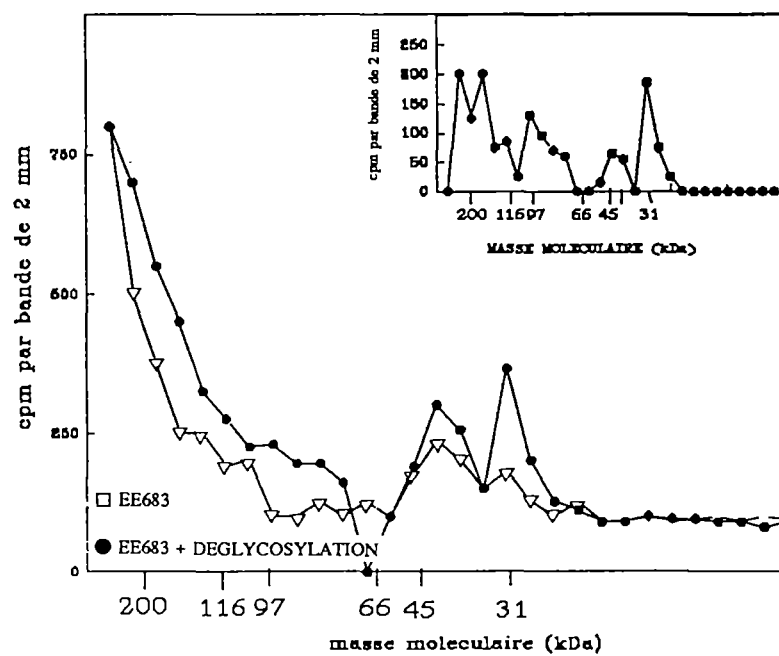
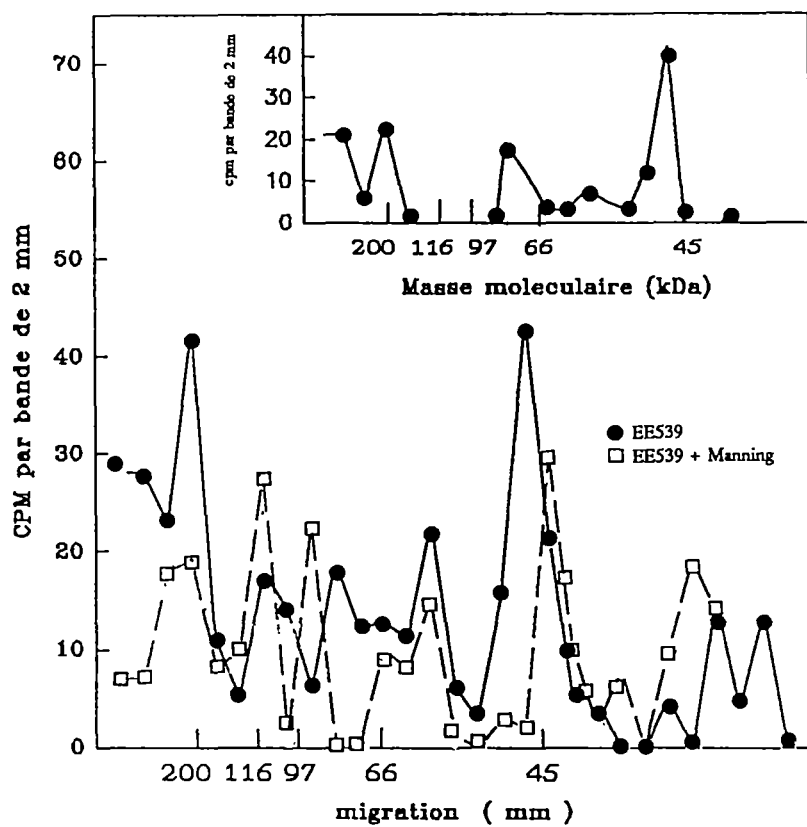


FIG 16 MIGRATION SUR SDS-PAGE 3-12 % DES PROTEINES HEPATIQUES
PHOTOMARQUEES EN PRESENCE DE ^{125}I -EE683

Profil de radioactivité d'un gel de polyacrylamide 3-12% après migration de 50 μg de protéines hépatiques photomarquées en présence de 1 nM d' ^{125}I -EE683. En A, des membranes qui ont été incubées en présence ou en absence de 1 μM d'antagoniste sélectif V_1 soit le composé de Manning avant l'irradiation des membranes. En B, les membranes ont subi ou non une déglycosylation de 24 heures en présence de 3 unités d'endoglycosidase F après le photomarquage. Après migration, les gels ont été découpés en bandelettes de 2x10 mm et leur contenu en radioactivité a été mesuré. Ces données sont représentées sous forme graphique. En médaillon, on présente le contenu en cpm des bandes où est soustrait le bruit de fond. Les standards de masses moléculaires pour A et B sont myosine (200 kDa), β -galactosidase (116.3 kDa), phosphorylase b (97.2 kDa), BSA (66.2 kDa), ovalbumine (45.0 kDa), anhydrase carbonique bovine (31.0 kDa), lysozyme (14.4 kDa)

A



B

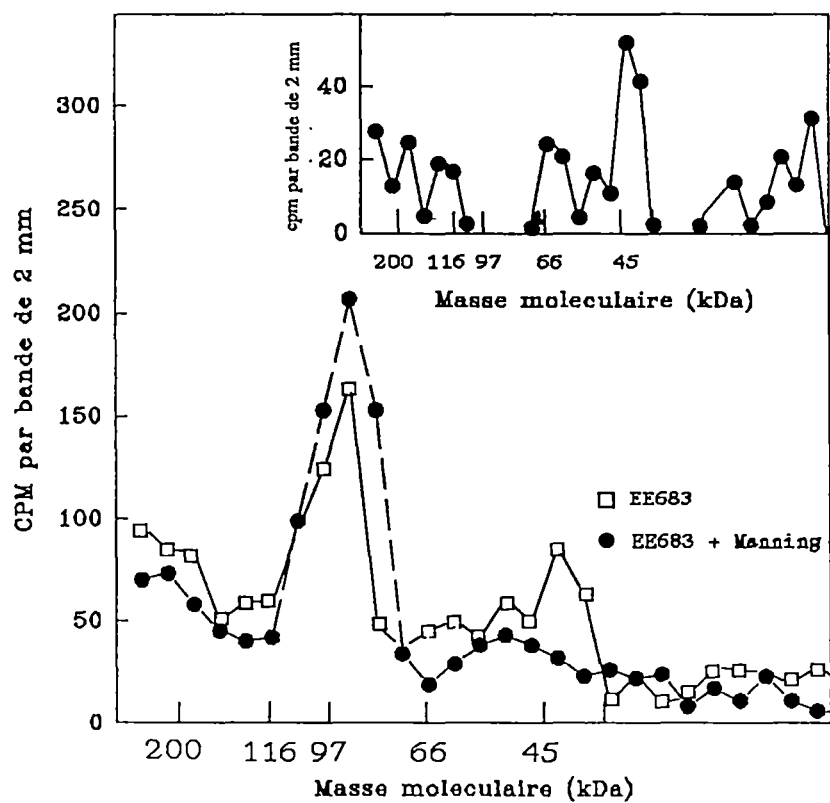


Fig 17 MIGRATION SUR SDS-PAGE 3-12% DES PROTEINES PROVENANT DES MEMBRANES PLAQUETTAIRES PURIFIEES, PHOTOMARQUEES EN PRESENCE DE ^{125}I -EE539 OU DE ^{125}I -EE683

Profil de radioactivité d'un gel de polyacrylamide 3-12% après migration de 50 μg de protéine membranaires purifiées photomarquées en présence de 1 nM d' ^{125}I -EE539. En A, des membranes ont été incubées en présence ou en absence de 1 μM d'antagoniste sélectif V_1 soit le composé de Manning avant l'irradiation des membranes. En B les membranes ont subi ou non une déglycosylation de 24 heures en présence de 3 unités d'endoglycosidase F après le photomarquage. Après migration, les gels ont été découpés en bandelettes de 2x10 mm et leur contenu en radioactivité a été mesuré. Ces données sont représentées sous forme graphique. En médaillon, on présente le contenu en cpm des bandes où est soustrait le bruit de fond. Les standards de masses moléculaires pour A et B sont: myosine (200 kDa), β -galactosidase (116.3 kDa), phosphorylase b (97.2 kDa), BSA (66.2 kDa), ovalbumine (45.0 kDa), anhydrase carbonique bovine (31.0 kDa).

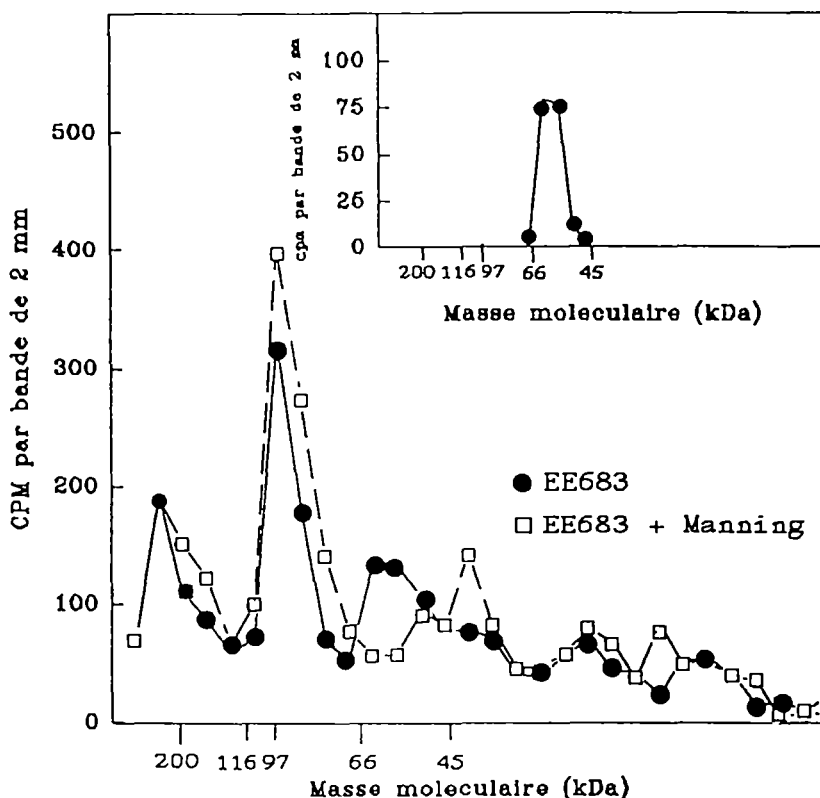


Fig 18 MIGRATION SUR SDS-PAGE 3-12% DES PROTEINES MEMBRANAIRES PROVENANT DES MEMBRANES PLAQUETTAIRES NON-PURIFIEES PHOTOMARQUEES A L'AIDE DE ^{125}I -EE683

Profil de radioactivité d'un gel de polyacrylamide 3-12% après migration de 50 μg de protéines hépatiques photomarquées en présence de 1 nM d' ^{125}I -EE683. Des membranes ont été incubées en présence ou en absence de 1 μM d'antagoniste sélectif V_1 soit le composé de Manning avant l'irradiation des membranes. Après migration, les gels ont été découpés en bandelettes de 2x10 mm et leur contenu en radioactivité a été mesuré. Ces données sont représentées sous forme graphique. En médaillon, on présente le contenu en cpm des bandes où est soustrait le bruit de fond. Les standards de masses moléculaires sont: myosine (200 kDa), β -galactosidase (116.3 kDa), Phosphorylase b (97.2 kDa), BSA (66.2 kDa), Ovalbumine (45.0 kDa).

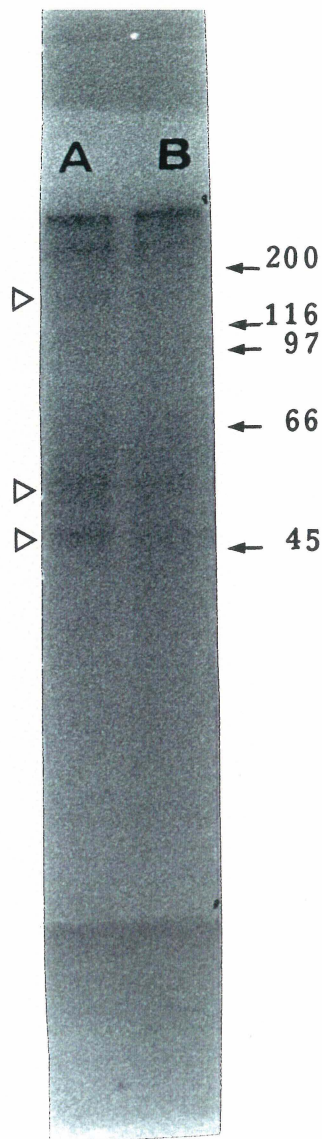


FIG 19 AUTORADIOGRAPHIE APRES UNE MIGRATION SUR SDS-PAGE 3-12 %
DES PROTEINES HEPATIQUES PHOTOMARQUEES EN PRESENCE DE
 ^{125}I -EE683

Autoradiographie d'un gel de polyacrylamide 3-12% après migration de 50 μg de protéines hépatiques photomarquées en présence de 1 nM d' ^{125}I -EE683. Les membranes ont été incubées en présence (A) ou en absence (B) de 1 μM d'antagoniste sélectif V_1 soit le composé de Manning. Les standards de masses moléculaires pour A et B sont: myosine (200 kDa), β -galactosidase (116.3 kDa), phosphorylase b (97.2 kDa), BSA (66.2 kDa), ovalbumine (45.0 kDa).

6 CARACTERISATION DES PEPTIDES

L'identité des peptides synthétiques a été vérifiée par l'analyse des A.A après l'hydrolyse acide (Tableau VIII). Les analyses démontrent que le contenu d'A.A théoriques de séquences peptidiques correspondent aux résultats obtenus par hydrolyse acide avec une erreur de ± 17 %. Le tryptophane n'est pas détectable par cette méthode d'analyse.

Tout les peptides possèdent un résidu ^3H -Lys en C-terminal. Grâce à ce traceur, on a évalué l'attachement des peptides antigéniques à la protéine porteuse. L'estimation du contenu en radioactivité β de 1 mg de protéine modifiée a permis le calcul du nombre de moles de peptides liés par mole de protéine porteuse. On a calculé un nombre entre 10.7 et 38 moles de peptides antigéniques par mole de KLH.

7 CARACTERISATION DES SERUMS

Trois lapins ont été immunisés pour chacun des cinq différents peptides couplés au KLH. La quantité d'anticorps sériques spécifiques anti V_1 ou V_2 des lapins a été analysée afin de déterminer les sérums les plus actifs. Les titres de chaque sérum ont été déterminés. Les valeurs des titres varient entre 0 et 5000. Pour chaque catégorie d'anticorps (AC), nous avons utilisé le sérum ayant le plus haut titre soit: pour le sérum

TABLEAU VIII ANALYSE D'ACIDES AMINES OBTENUS APRES HYDROLYSE ACIDE DES PEPTIDES SERVANT A L'IMMUNISATION

PEPTIDES														
Littéraire/exp.	Arg	Lys	Thr	Ser	Asx	Glx	Pro	Gly	Ala	Val	Ile	Leu	Tyr	Phe
Ag-1	-- --	1 0.99	2 2.20	-- --	3 2.81	1 0.95	-- --	1 1.20	-- --	1 0.94	---	-- --	-- --	-- --
Ag-1 tritié	-- --	2 1.99	2 2.20	-- --	3 2.81	1 0.95	-- --	1 1.20	---	---	---	-- --	-- --	-- --
Ag-2*	-- --	-- --	1 0.97	1 1.02	3 2.41	1 1.28	-- --	-- --	-- --	-- --	1 1.10	-- --	-- --	1 1.41
Ag-2* tritié	-- --	1 1.05	1 1.03	1 0.89	2 2.13	1 1.22	-- --	-- --	---	---	1 0.83	-- --	-- --	1 1.11
Ag-3	-- --	-- --	-- --	1 1	2 2	-- --	-- --	3 3	-- --	2 2	-- --	-- --	-- --	1 1
Ag-3 tritié	-- --	1 0.88	-- --	1 1.21	1 1.71	-- --	---	3 2.91	-- --	1 0.88	-- --	-- --	-- --	1 1.34
Ag-4	1 1.5	-- --	-- --	-- --	-- --	2 1.99	4 3.85	-- --	1 1.10	-- --	-- --	1 1.35	-- --	-- --
Ag-4 tritié	1 1.19	1 1.33	-- --	-- --	-- --	2 1.68	4 3.61	-- --	1 1.11	-- --	-- --	1 1.13	-- --	-- --
Ag-5* tritié	1 1.35	1 1.27	0.30 0.30	-- --	-- --	1 1.09	1.30 1.32	1 1.19	1 1.28	-- --	1 1.01	-- --	1 1.04	1 0.99

contient un Tryptophane, cet acide aminé n'est pas détectable dans cette analyse.

Ag: séquence peptidique qui a été utilisée pour l'immunisation, exp.: expérimental

de lapin auquel le peptide 1 a été immunisé (AC-1): 4640, AC-2: 1907, AC-3: 3800, AC-4: 2000, AC-5: 5000. Ces titres des sérums ont été maintenus constants à l'aide de rappels fréquents. Les 40 ml de sérum recueillis ont été séparés en fraction d'un ml. Ces fractions ont été congelées à -80°C. Certaines fractions de sérum ont été lyophilisées, la capacité de liaison de ces anticorps sur l'antigène ne semble pas être affectée par cette étape. Les sérums de lapins retenus ont été analysés pour leur spécificité. Ces anticorps ont été mis en présence des peptides qui ont servi à l'immunisation et d'autres peptides qu'ils ne devraient pas reconnaître. L'anticorps 1 (AC-1) reconnaît le peptide antigénique 1 (Ag-1), l'antigène 2 (Ag-2) et l'antigène 4 (Ag-4). L'AC-1 reconnaît plus que les autres l'albumine sérique de boeuf et l'anhydrase carbonique. La présence de ces protéines a développé une coloration d'un dixième du signal maximal obtenu par la présence de l'Ag-1 pour une même quantité de peptides. L'AC-2 possède une grande spécificité ne reconnaissant que l'Ag-2. L'AC-3 a eu peu de spécificité, il reconnaît l'Ag-4 et l'Ag-2. L'AC-3 en contact avec ces antigènes (Ag-4 et Ag-2) a développé une coloration respectivement de 85 % et 50 % du signal maximal obtenu d'une même quantité d'Ag-3. L'AC-4 a été le plus spécifique, ne reconnaissant que son antigène (Ag-4). L'AC-5 a été spécifique ne reconnaissant que son antigène et l'antigène 4 dans une proportion de 22 % de la référence maximale.

8. CARACTERISATION DES MASSES MOLECULAIRES DES RECEPTEURS V_1 OU V_2 PAR BUWARDAGE "WESTERN BLOT".

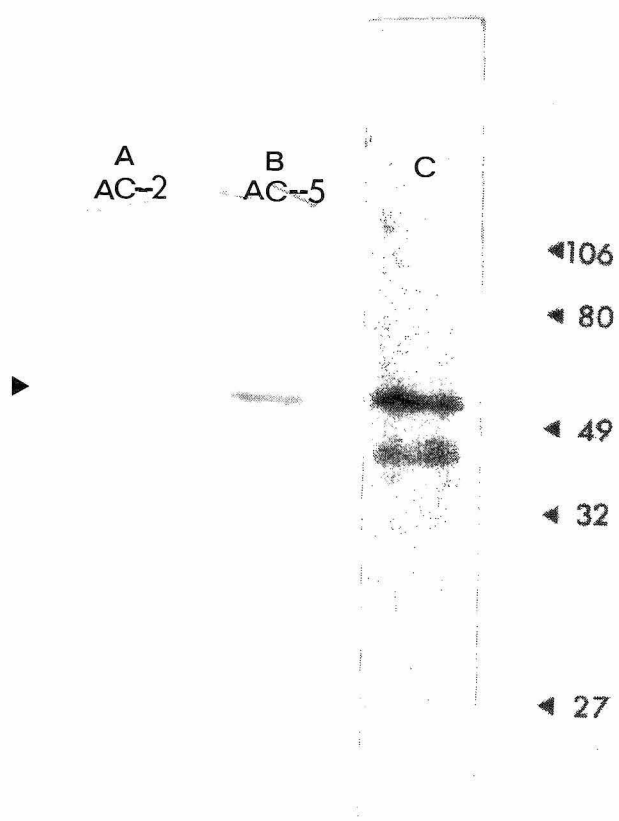
Les protéines solubilisées des membranes de foie et de rein ont été analysées sur un gel de polyacrylamide 3-12%. Ensuite, ces protéines ont été transférées sur une membrane de

nitrocellulose. Chaque bande de migration a été soigneusement découpée et incubée en présence des anticorps primaires (1:100). Chacun des anticorps primaires utilisés ont une affinité supérieure à 10 nM. Des IC_{50} ont été établis pour les sérums et ont été exprimés en log négatifs de la concentration molaire soit pour l'AC-1:8, l'AC-2:10.85, l'AC-3:9.28, l'AC-4:8.99, l'AC-9.35. Par la suite, les bandelettes ont été exposées à des anticorps secondaires (1:5000). Ces IgG et IgM de chèvre reconnaissent la partie constante des anticorps de lapin. L'anticorps secondaire est relié à une peroxydase. En présence de peroxide d'hydrogène et de diaminobenzidine, un matériel brun est déposé à l'endroit de liaison de l'anticorps secondaire. La localisation de ces taches sont comparée à la localisation des protéines de références pour déterminer la masse moléculaire apparente des récepteurs V_1 ou V_2 .

A la figure 20, les protéines membranaires hépatique (partie A) et rénales de rat (partie B) transférées sur nitrocellulose ont été incubées en présence des anticorps dirigés contre V_1 ou V_2 . Aucune bande n'a été détectée à l'aide de l'AC-1 (n=1) (résultat non-illustré) cependant une bandes correspondant à une masse de 60.3 ± 0.47 kDa a été observées en présence de l'AC-2 (n=3) (fig 20A, bande A). Une masse de 66 kDa ont été déterminées à l'aide de l'AC-3 (n=2) et de l'AC-4 (n=2) (fig 20B, bande A et fig 20B, bande B). L'AC-5, dirigé contre la partie commune entre V_1 et V_2 a mis en évidence une masse de 61.6 ± 9.5 kDa pour V_1 (fig 20A, bande B). L'utilisation de l'AC-5 dans une incubation en présence de membranes de rein a permis d'observer une bande faible correspondant à une masse de 61.5 kDa pour V_2 . L'utilisation de l'AC-2 et de l'AC-5 a mis en évidence une masse moléculaire de 38 pour le récepteur V_1 déglycosilé (Fig 21).

Les protéines utilisées dans le transfert sur nitrocellulose à la figure 20A sont des protéines membranaires hépatiques photomarquées à l'aide de l'analogue ^{125}I -EE683. L'image de l'autoradiographie permet d'observer que les bandes mise en évidence à l'aide de l'AC-2 ou l'AC-5 (fig 20A, bandes A et B respectivement) semblent correspondre à la localisation du récepteur radio-marqué (bande C).

A Foie



B Rein

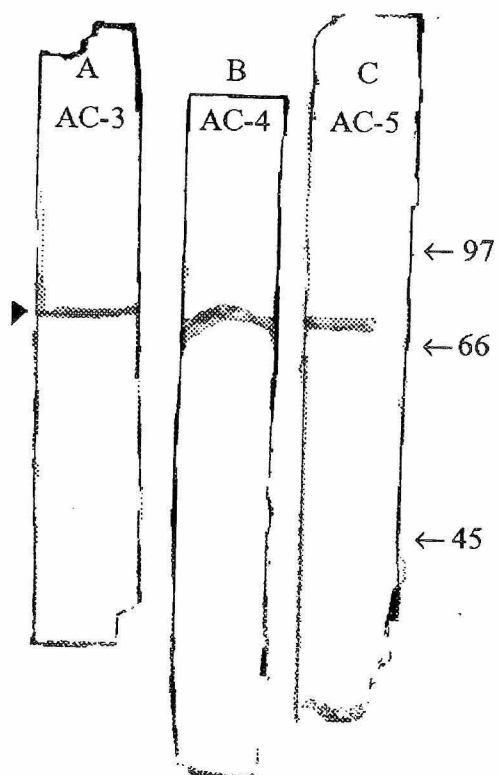


FIG 20 IMMUNODETECTION DES RECEPTEURS D'AVP SUR DES
PREPARATIONS HEPATIQUES ET RENALES DE RAT

Cinquante µg de protéines membranaires de foie de rat photomarquées à l'aide du radio-ligand photoactivable ^{125}I -EE683 (partie A) et 50 µg de protéines membranaires de rein (partie B) ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose après une migration sur un gel de SDS-polyacrylamine 3-12%. Chaque bande a été incubée avec un anticorps distinct. Pour la partie A, les bandes ont été incubées avec l'AC-2 (A) et l'AC-5 (B). Après immunodétection, les bandes ont été exposées à un film radiographique pour obtenir l'autoradiographie de celles-ci soit C.

Dans la partie B, les membranes de rein ont été incubées avec l'AC-3 (A), l'AC-4 (B), l'AC-5 (C). Les standards de masses moléculaires utilisés ont été la phosphorylase b (97.2 kDa), D: BSA (66.2 kDa), E: ovalbumine (45.0 kDa).

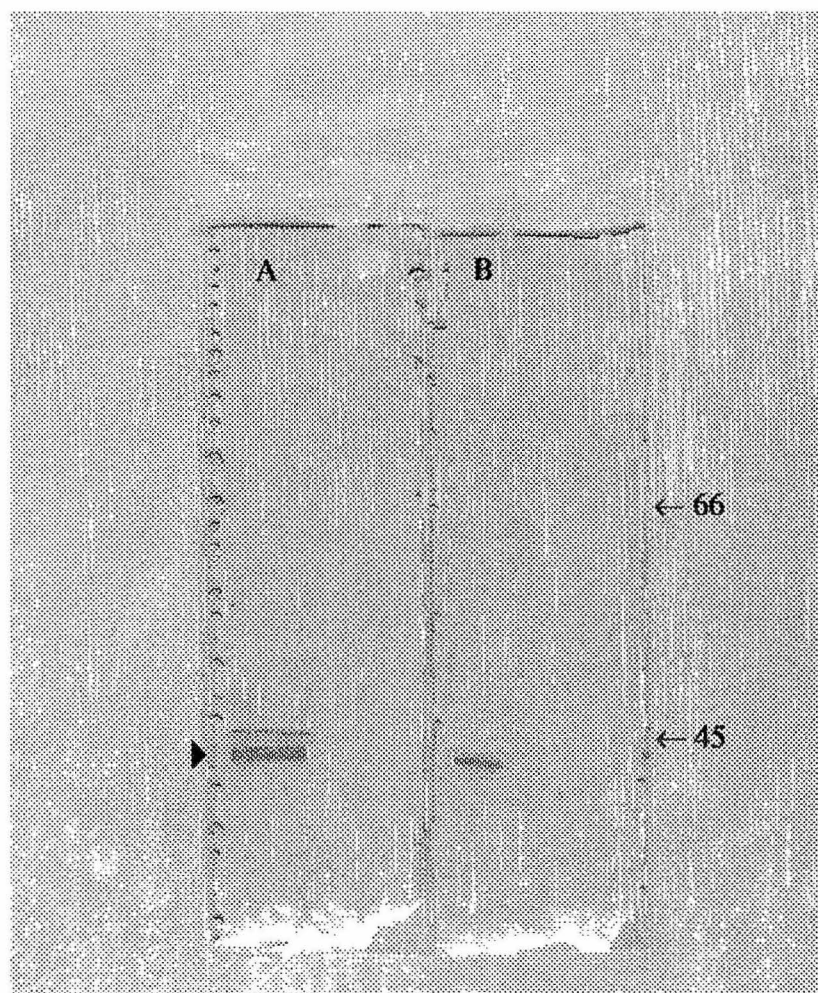


FIG 21 IMMUNODETECTION DES RECEPTEURS DEGLYCOSYLES D'AVP
SUR DES PREPARATIONS HEPATIQUES DE RAT

Cinquante μg de protéines membranaires de foie de rat déglycosylées ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose après une migration sur gel de SDS-polyacrylamide 3-12%. Chaque bande a été incubée avec un anticorps distinct. Les bandes ont été incubées avec l'AC-2 (A) ou l'AC-5 (B). Les standards de masses moléculaires utilisés sont la BSA (66.2 kDa), l'ovalbumine (45.0 kDa).

9. ETUDE DE LIAISON DES ANTICORPS SUR DES LIGNEE CELLULAIRES

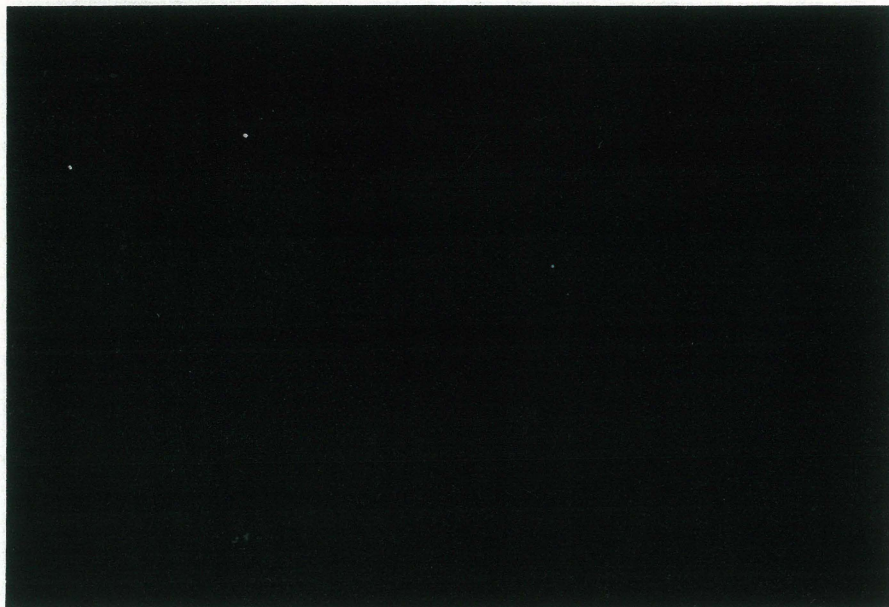
Dans cette étude, l'AC-2 et l'AC-4 ont été utilisés sur des cellules de la lignée PT₁ et sur la lignée cellulaire A₇R₅. La lignée PT₁ consiste en des cellules épithéliales du tubule proximal de rein humain et la lignée A₇R₅ consiste en des cellules de muscle lisse d'aorte thoracique foetale de rat qui expriment seulement le récepteur V₁ (THIBONNIER et al., 1992)

L'étude d'immunofluorescence entreprise sur des cellules A₇R₅ à l'aide de l'AC-2, l'AC-4 a permis d'observer la liaison de l'anticorps AC-2 à une protéine de surface. A la figure 22, seules les cellules exposées à l'AC-2 (sérum anti-V₁) ont émit une fluorescence. Aucune fluorescence n'a été observée à la surface des cellules exposées au sérum anti-V₂ (l'AC-4) et à l'anticorps secondaire.

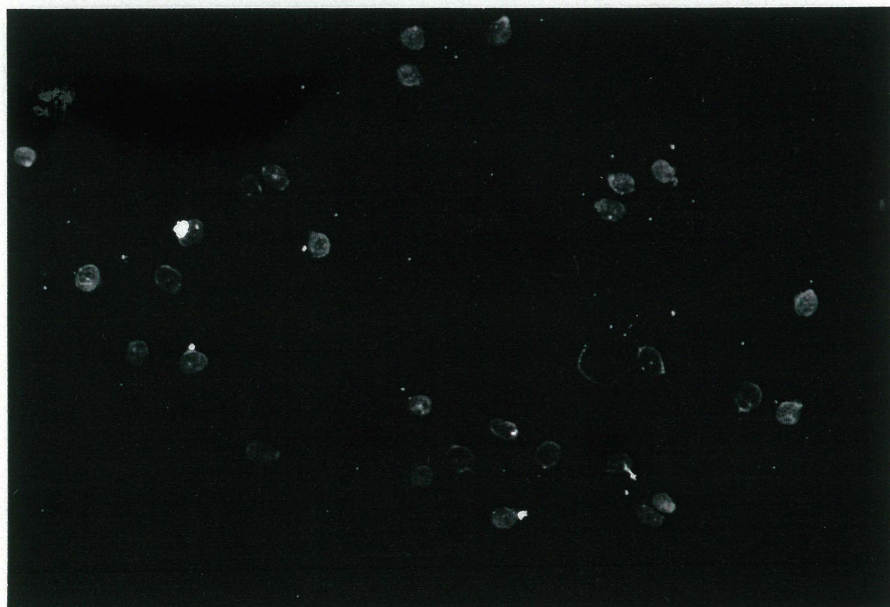
L'existence de récepteurs d'AVP sur la lignée cellulaire PT₁ a été démontrée par un déplacement de l'³H-AVP par de l'AVP. Le déplacement de l'³H-AVP par 1 µM d'AVP donne une valeur de liaison minimale de 143.3 ± 15.5 CPM (n=4) tandis que la liaison maximale a été déterminée en absence d'AVP. Cette valeur se situe à 315 ± 12 CPM (n=9) (résultats non-montrés). A la figure 23, les cellules PT₁ ont été incubées en présence du sérum anti-V₁ (AC-2) (fig 23b) et du sérum anti-V₂ (AC-4) (fig 23c), une fluorescence a été observée dans les deux cas. Cependant aucune fluorescence n'a été observée chez les cellules incubées seulement en présence de l'anticorps secondaire (fig 23a).

Un transfert de protéine a été fait à partir des préparations membranaires des cellules PT₁. Les résultats sont illustrés à la figure 24. Dans la bande A qui a été incubée avec un sérum (1:100) contenant l'anticorps AC-2, plusieurs taches ont été observées, cependant la tache la plus lourde a été située à 43 kDa. Dans la bande B qui a été incubée dans un sérum (1:100) contenant l'anticorps AC-4, des bandes ont été développées, cependant la ayant la masse moléculaire la plus élevé est située à 47 kDa. Lorsque les bandelettes ont été incubées en présence simultanée d'AC-2 et d'AC-4, la présence de ces deux mêmes bandes a été démontrée. L'utilisation d'un sérum (l'AC-5) qui ne peut différencié entre les divers types de populations de récepteur tels que le V₁ ou V₂ a permis de développer un patron de taches semblable à celui développé en présence simultanée d'AC-2 et d'AC-4.

A



B



C

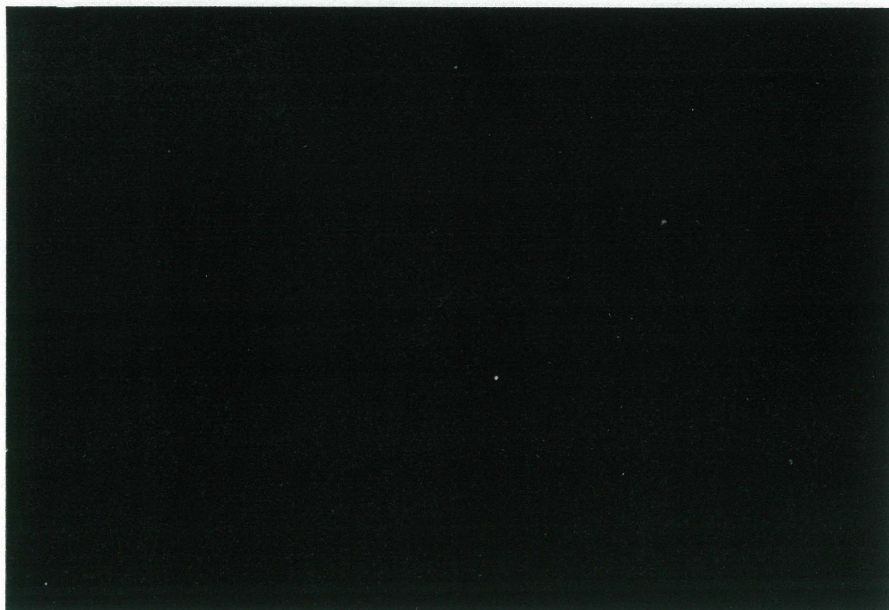


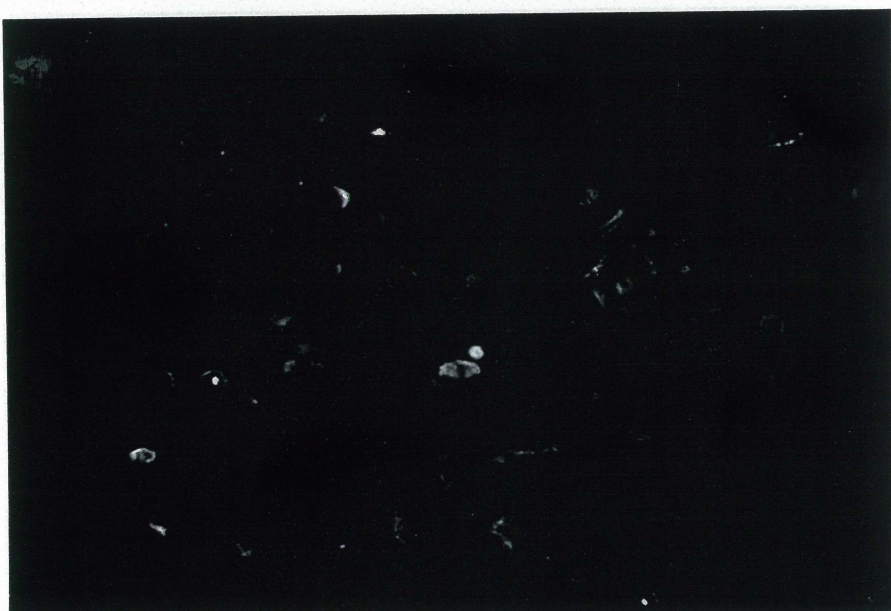
FIG 22 ETUDE D'IMMUNOFLUORESCENCE SUR DES LIGNEES CELLULAIRES
DE MUSCLE LISSE D'AORTE THORACIQUE DE RAT FOETAL (A_7R_5) À
L'AIDE D'ANTICORPS SELECTIFS ENVERS LES RECEPTEURS D'AVP

Les cellules ont été incubées en présence d'anticorps dilués 1:30. En A, les cellules ont été incubées en présence de l'anticorps secondaire seulement et servent de témoin. En B, les cellules ont été mises en présence de l'anticorps sélectif au récepteur V_1 soit l'AC-2. En C, les cellules ont été mises en présence de l'anticorps sélectif envers le récepteur V_2 soit l'AC-4.

A



B



C

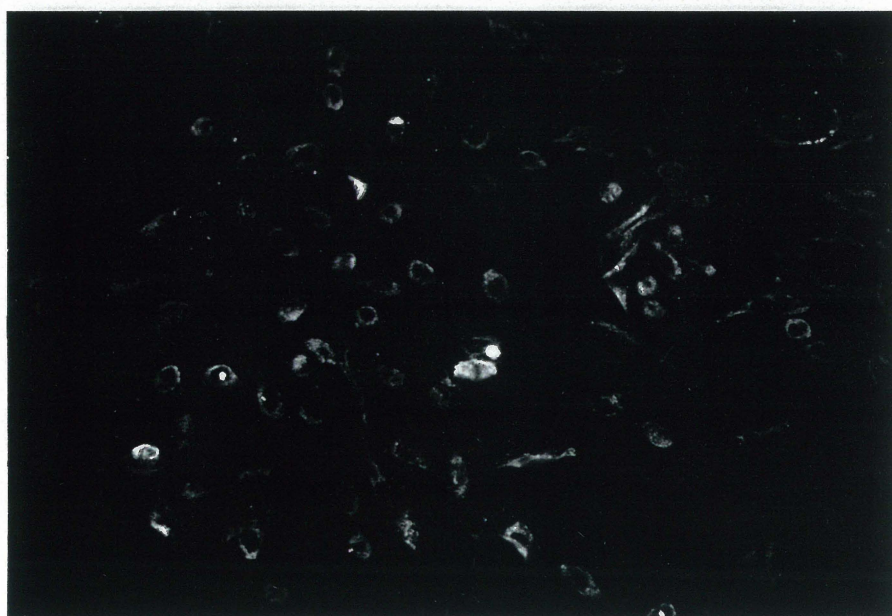


FIG 23 ETUDE D'IMMUNOFLUORESCENCE SUR DES LIGNEES CELLULAIRES
D'EPITHELIUM DU TUBULE PROXIMAL RENAL HUMAIN (PT₁) À
L'AIDE D'ANTICORPS SELECTIFS ENVERS LES RECEPTEURS D'AVP

Les cellules ont été incubées en présence d'anticorps dilués 1/30. En A, les cellules n'ont été incubées qu'en présence de l'anticorps secondaire seulement et servent de témoin. En B, les cellules ont été incubées en présence de l'anticorps sélectif au récepteur V₁ soit l'AC-2. En C, les cellules ont été incubées en présence de l'anticorps sélectif envers le récepteur V₂ soit l'AC-4.

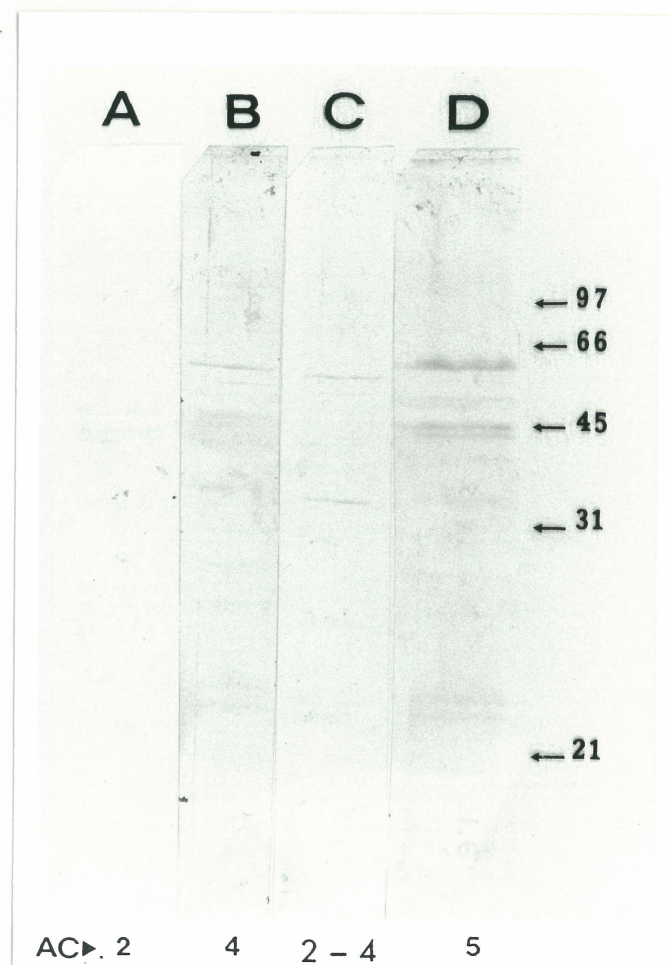


FIG 24 CARACTERISATION DE LA MASSE MOLECULAIRE DES RECEPTEURS
D'AVP DE LA LIGNEES CELLULAIRES PT₁ PAR IMMUNODETECTION

Cinquante µg de protéines des préparations membranaires des cellules du tubule proximal rénal humain ont été transférées sur une membrane de nitrocellulose après une migration sur un gel de SDS-polyacrylamide 3-12 %. Ces bandes ont été incubées en présence d'anticorps dilués 1:100. La bande A a été incubée en présence d'AC-2, la bande B a été incubée en présence d'AC-4, la bande C a été incubée en présence d'AC-2 et d'AC-4 et la bande D a été incubée en présence d'AC-5. Les standards moléculaires utilisés ont été la phosphorylase b (97.2 kDa), la BSA (66.2 kDa), l'ovalbumine (45.0 kDa), l'anhydrase carbonique bovine (31.0 kDa), l'inhibiteur de trypsine (21.5 kDa).

DISCUSSION

..

Le but de notre étude était de produire des outils avec une grande sélectivité envers les récepteurs V_1 et V_2 par la synthèse peptidique d'analogues et par le développement d'anticorps dirigés contre les récepteurs V_1 et V_2 de l'AVP.

1 CARACTERISATION DES ANALOGUES PHOTO-SENSIBLES

Nous avons étudié trois analogues peptidiques contenant la nitrophénylalanine, un analogue photomarqueur contenant l'azidophénylalanine et six analogues photomarqueurs contenant le p-benzoylphénylalanine (Bpa) comme groupement photomarqueur. Les analogues contenant la nitrophénylalanine et le photomarqueur contenant l'azidophénylalanine ont montré une plus grande affinité pour le récepteur V_1 que pour le récepteur V_2 . Leur constante d'affinité pour le récepteur hépatique V_1 a été de l'ordre du nM tandis que leur constante d'affinité pour le récepteur rénal V_2 a été de l'ordre du μ M. L'analogue photomarqueur le plus sélectif pour le récepteur V_1 de ces deux catégories a été le EE539: [DMPA¹, Phe(N₃)², Val⁴, Lys⁸, D-tyr⁹]VP, il possède une constante d'affinité pour le récepteur hépatique V_1 (0.6 ± 0.1 nM) semblable à celle obtenue par l'AVP (1.0 ± 0.8 nM). Cependant la constante d'affinité du EE539 (350 ± 34 nM) au niveau du récepteur V_2 montre que le EE539 a 100 fois moins d'affinité que l'AVP (3.0 ± 2.0 nM). Le EE539 a montré un ratio de sélectivité (V_1/V_2) de 0.002. Ce degré de sélectivité pour le récepteur V_1 a permis de l'utiliser comme photomarqueur sélectif.

Le EE655 et le EE654 n'ont pas montré une aussi grande différence d'affinité entre les récepteurs V_1 et V_2 par rapport au EE539. Cependant, les valeurs de la constante d'affinité du EE654 sur les récepteur V_2 (109 nM) et V_1 (1.8 nM) sont respectivement 10 fois supérieures à celles du EE655 sur les récepteurs V_2 (18 nM) et V_1 (0.19 nM). L'augmentation de l'hydrophobicité par la modification des groupements méthyls par des groupements éthyls semble faire augmenter l'affinité des analogues sur les deux types de récepteurs V_1 et V_2 . Les récepteurs semblent être très influencés par la présence de groupes hydrophobes comme il a été constaté lors de l'étude de BARBEAU (1991).

A partir de ces observations, une nouvelle série d'analogues a été synthétisée dans le but d'obtenir d'abord un meilleur rendement de marquage et ensuite pour obtenir un analogue sélectif pour V_2 . La séquence du V_1 -sélectif EE683 a été développée à partir de celle du EE539 dans laquelle l'azidophénylalanine en position 2 a été remplacée par la p-benzoylphenylalanine (Bpa). Les changements structuraux ainsi que la nature hydrophobe du peptide résultant de l'introduction du Bpa ont eu pour effet de diminuer l'affinité de l'analogue pour le récepteur V_1 (2 nM) mais n'a pas affecté l'affinité des analogues envers le récepteur V_2 (293 nM). Le peptide EE683 avec un ratio de sélectivité V_1/V_2 de 0.007 est un analogue sélectif au récepteur V_1 , malgré qu'il n'est pas aussi sélectif envers le récepteur V_1 que le EE539. Cependant, il est assez sélectif pour être utilisé dans l'étude de photomarquage du récepteur V_1 de foie de rat.

La séquence du peptide EE683 a été modifiée dans le but d'augmenter sa sélectivité envers le récepteur V_2 afin d'obtenir un antagoniste sélectif V_2 contenant le résidu p-benzoylphénylalanine. Premièrement, un résidu L-isoleucine a été inséré en position 4 afin d'augmenter la sélectivité pour le récepteur V_2 tel que décrit par JARD (1990). La glycine en C-terminal (position 9) qui est nécessaire pour l'activité biologique mais non pour la liaison de l'analogue n'a pas été introduite dans les peptides que nous avons synthétisés (MANNING et al., 1984). Lors d'essai d'accumulation d'AMPc sur une lignée cellulaire contenant le récepteur V_2 , nous avons pu observer que la déletion de la glycine donne un caractère antagoniste à l'analogue (résultat non illustré). La troisième modification a été l'introduction d'une nitrophénylalanine qui a été intégrée en position 3 pour obtenir un site d'iodation par la réaction de Gatterman-Sandmeyer. Le peptide EE692 qui devrait être un analogue sélectif pour le récepteur V_2 , n'a montré aucune liaison sur les récepteurs d'AVP. Le changement du premier A.A soit le DMPA par le CPA a permis un changement structural important qui a permis d'obtenir une liaison de l'analogue sur les récepteurs d'AVP. Nous avons ainsi obtenu le EE693: [CPA¹, D-Bpa², Phe(NO₂)³, Ile⁴, Arg⁸, desGly⁹]VP qui semble être un analogue sélectif envers le récepteur V_2 avec des affinités apparentes de 246 nM pour le récepteur V_1 et de 3.0 pour le récepteur V_2 . Ce radio-marqueur a montré un ratio sélectif V_2/V_1 de 0.02; il pourrait donc être utilisé dans une étude de caractérisation du récepteur V_2 par photomarquage dans une préparation contenant un mélange des deux récepteurs comme l'"homogénat" de rein (V_1 provenant des parois vasculaires).

L'effet optimal de la position de la p-benzoylphenylalanine (Bpa) dans la séquence peptidique a été étudié. L'introduction du Bpa en position 3 a amené une augmentation d'hydrophobicité ce qui a pour effet de diminuer l'affinité d'une manière drastique au point que le EE684 ne lie plus le récepteur V_2 et montre une constante d'affinité de 343 nM pour le récepteur V_1 . L'utilisation du Bpa en position 9 comme dans le peptide EE696: [Cpa¹, D-Ile², Phe(NO₂)³, Ile⁴, Bpa⁹]VP a diminué l'affinité de l'analogue sur le récepteur V_1 (1618 nM) et le récepteur V_2 (135 nM). En comparant les constantes d'affinité obtenues avec les divers analogues, la position 2, comme dans les peptides EE683 et EE693 semble être la meilleure localisation pour introduire le Bpa. Cette localisation du Bpa a permis de diminuer l'apport de la variation structurale et hydrophobe du Bpa dans l'analogue et ainsi obtenir une haute affinité pour le récepteur V_1 ou V_2 .

Les courbes de déplacement de ³H-AVP par les analogues sont parallèles à celles déplacées par l'AVP. Le déplacement dans les deux cas s'effectue à l'intérieur d'un intervalle de concentration ne dépassant pas deux unités logarithmiques. Ce sont des indications que les analogues compétitionnent pour les mêmes sites de liaison que l'AVP.

Les liaisons des analogues aux récepteurs d'AVP sont régies par une balance très fine d'interactions, l'exemple le plus frappant a été la comparaison entre le comportement du EE693 et celui du EE717, ces deux analogues ne diffèrent que dans leur C-terminal, soit un groupement carboxyl libre ou un carboxyamide. Pourtant, l'utilisation du peptide hydroxylé (EE717) augmente l'affinité pour le récepteur V_1 (20 nM) 10 fois par rapport

au peptide amide (EE717) (246 nM) tandis que leur affinité respective au niveau des récepteurs V_2 reste semblable (3.0 nM).

Les résultats de cette étude montrent que nous avons synthétisé deux photomarqueurs analogues sélectifs au récepteur V_1 et un photomarqueur sélectif au récepteur V_2 soit le EE539 qui semble être l'analogue qui a la plus grande constante d'affinité (0.6 nM) pour le récepteur V_1 et le photomarqueur EE683 qui a une constante d'affinité de 2 nM. Un photomarqueur sélectif pour le récepteur V_2 a été synthétisé; le EE693 qui possède une meilleure constante d'affinité soit 3 nM pour le récepteur V_2 que celle du meilleur antagoniste cyclique à ce jour, soit le [CPA¹,D-Ile², Ile⁴, Arg⁸]VP qui a une constante d'affinité de 9 nM pour le récepteur V_2 . Le ratio de sélectivité (V_1/V_2) du EE693 est légèrement plus élevé que celui du meilleur analogue cyclique connu soit 49 par rapport à 39 (JARD et JAMISON, 1991). Nos résultats ont montré que le EE693 était un analogue photoactivable sélectif pour le récepteur V_2 et qu'il pourrait être classifié comme étant un des analogues les plus prometteurs dans les expériences de photomarquage grâce à la possibilité d'incorporer un ¹²⁵I sur le résidu phénylalanine situé en position 3. L'utilisation de ce radio-ligand a deux avantages dans l'étude de la caractérisation des récepteurs V_2 soit sa haute activité spécifique et sa grande sélectivité pour le récepteur V_2 .

2. RADIO-IODATION DE CERTAINS ANALOGUES PHOTOSENSIBLES

Les photomarqueurs EE539 et EE683 ont été tous deux iodés à l'aide de la méthode à l'Iodo-gen (Escher et al., 1984). Cependant, une diminution de rendement d'iodation de 60% à 28% a été observée. Cette baisse peut s'expliquer par une perte plus importante d'une partie du ^{125}I -EE683 sur les parois du contenant, la seringue, les billes de la colonne. L'utilisation de colonne d'HPLC pour produits lipophiles (C-8 ou C-4) aurait possiblement diminué l'absorption du peptide sur la colonne. Cependant, la diminution de la résolution de la colonne pourrait entraîner une diminution de la qualité de la séparation entre le peptides et sa forme radio-iodée. Pour éviter d'obtenir une activité spécifique du radio-ligand sous évaluée, nous continuerons d'utiliser la colonne C-18.

La méthode de Gatterman-Sandmeyer (BOSSE et al., 1989) a été utilisée pour ioder le EE693. Contrairement à la méthode d'Iodo-gen qui permet l'incorporation d'un atome d'iode sur une tyrosine en position méta, la méthode de Gatterman-Sandmeyer introduit l' ^{125}I sur la position para du cycle benzénique de la phénylalanine. Une activité spécifique de 750 Ci/mmeole a été déterminée pour ce radio-ligand à l'aide des courbes de saturation et de dose-déplacement. Cette faible activité spécifique peut être expliquée par plusieurs facteurs: une contamination de la source d' ^{125}I par de l'iode non-radioactive, une contamination de l'eau par des ions chlore ou brome qui compétitionnent avec l' ^{125}I pour l'incorporation. Le rendement d'iodation de 10 % peut s'expliquer comme dans le cas du ^{125}I -EE683 par une perte importante de produit sur la colonne et l'injecteur. Une autre cause du faible rendement observé est la réduction du pont disulfure, cette décyclisation

du peptide démontrée par le profil d'élution sur HPLC du ^{125}I -EE693 arrive lors des réactions successives que subissent les peptides dans la méthode de Gatterman-Sandmeyer. A la figure 8, l'aire sous le pic représentant le radiomarqueur linéaire équivaut à 66 % de l'aire sous le pic représentant l'analogue iodé cyclique. Afin d'améliorer le rendement, on a ajouté une étape à la méthode originale (BOSSE et al., 1989), Après la réduction du résidu nitro en résidu amino, le peptide a été lyophilisé pour favoriser sa recyclisation, cette modification n'a cependant permis d'augmenter le rendement que de $\pm 5\%$. Afin d'augmenter le rendement de marquage, il faudrait modifier la réaction afin d'obtenir une diminution de la réduction des ponts disulfures et ainsi nous pourrions obtenir un rendement de $\pm 20\%$.

Les expériences de saturation des récepteurs V_1 ou V_2 avec les produits iodés respectifs permettent de calculer leurs activités spécifiques ainsi que leurs affinités et le nombre de sites de liaison de chacune des préparations. On observe un nombre de sites de 1.02 ± 0.15 et 1.37 ± 0.19 pmol par mg de protéine hépatique lors de l'étude à l'aide du ^{125}I -EE539 et de ^{125}I -EE683 respectivement. Les deux radiomarqueurs permettent d'observer un nombre semblable de sites sur la préparation membranaire. Un nombre de sites observé qui se rapproche du nombre évalué par BARBEAU (1992) et FAHRENHOLZ et al. (1986) soit respectivement 0.9 et 2.2 ± 1 pmole de récepteur par mg de protéine. Le nombre de site de liaison et la constante d'affinité de l'AVP qui sont de l'ordre du nM démontrent que ces préparations membranaires sont satisfaisantes pour l'étude de photomarquage du récepteur V_1 .

La préparation de membrane rénale possède un nombre moindre de récepteurs d'AVP que les préparations membranaires hépatiques. Un nombre de 4 fmole de récepteur par mg de protéine a été déterminé à l'aide de l' ^3H -AVP. Lors d'une expérience de liaison et de saturation sur les membranes de rein de rat à l'aide du ^{125}I -EE693, nous avons pu calculer un nombre de 5 fmole de sites de liaison par mg de protéine. Ces nombres de site sont semblables à celui observé à l'aide de l' ^3H -AVP par FAHRENHOLZ (1985). Ces nombres de sites ont été déduits par une régression linéaire des valeurs obtenue de notre unique étude de liaison et de saturation. Ces droites ont été tracées à l'aide d'un programme de régression linéaire. Le coefficient de régression est de 0.80. Pour obtenir ce coefficient, nous avons calculé la régression à l'aide du plus grand nombre de degré de liberté possible.

On peut observer dans la figure 12 beaucoup de renseignements. Ces rectilignes suggèrent que le radio-ligand (^{125}I -EE693) ne touche qu'à une seule population de récepteur au niveau du rein. Les pentes des deux droites nous informent que l'affinité du ligand V_2 sélectif devrait être semblable à l'affinité de l' ^3H -AVP. Ces résultats sont préliminaires et devront être reconfirmé lorsque le peptide radio-actif sera disponible. Malgré que l'analogue semble être un futur outil de caractérisation du récepteur V_2 , l'utilisation du ^{125}I -EE693 pourrait bien être limitée par sa disponibilité et la possibilité d'augmenter le rendement d'iodation du peptide par la méthode de Gatterman-Sandmeyer.

Une expérience exploratrice de photomarquage des récepteurs V_1 plaquettaires a été entreprise en collaboration avec THIBONNIER de Cleveland. La liaison des radio-marqueurs sur ces protéines membranaires a été étudiée dans le but de photomarquer ultérieurement ces récepteurs. Des constantes d'affinité (K_d) pour ^{125}I -EE539 ont été déterminées, soit 1.02 nM pour la fraction des protéines membranaires plaquettaires non-purifiées et 0.72 nM pour la fraction contenant les protéines membranaires plaquettaires purifiées sur sucrose. Le ^{125}I -EE683 montre un K_d de 0.27 nM pour la fraction membranaire non-purifiée et de 0.56 nM pour la fraction purifiée. Avec les affinités que les radio-ligands ont montré pour les récepteurs V_1 , ils peuvent être utilisés pour le photomarquage, malgré que le nombre de récepteur V_1 sur ces préparations membranaires soit faible par rapport au nombre de sites retrouvés au niveau du foie. Dans les préparations non-purifiées, on évalue la concentration à 0.02 pmole de sites V_1 par mg de protéine. On retrouve en moyenne 0.06 pmole de site V_1 par mg de protéine soit seulement 3 fois plus que dans la préparation non-purifiée. Une explication plausible à ce faible taux d'augmentation malgré la purification est que la capacité de liaison du radio-ligand sur les récepteurs V_1 des plaquettes purifiées est diminuée, si les récepteurs ne sont pas insérés dans une vésicule phospholipidique artificielle dans une configuration "out-side-out" pour ainsi retrouver sa structure tertiaire native comme il a été suggéré dans le cas de $l^3\text{H}$ -AVP (THIBONNIER et al., 1990).

Chaque représentation de Scatchard a montré une linéarité indiquant que les radio-marqueurs ont une interaction avec un seul type de sites de liaison sur leur tissu respectif.

Dans le cas du rein où il existe deux types de récepteurs d'AVP soit principalement le récepteur V_2 et en faible proportion le récepteur V_1 , le ^{125}I -EE693 ne semble reconnaître qu'un seul site. Ce résultat, quoique préliminaire, démontre le potentiel d'utilisation de ^{125}I -EE693 à ces concentrations pour l'étude du photomarquage du récepteur V_2 (OSTROWSKI et al., 1992, AMMAR et al., 1992). L'affinité de nos radio-marqueurs sur les récepteurs d'AVP du foie ou du rein (^{125}I -EE539: 0.6 ± 0.1 nM, ^{125}I -EE683: 2.0 ± 0.4 nM, ^{125}I -EE693: 2.0 ± 1 nM) coïncide à celles définies par l'équation de Cheng-Prusoff (EE539: 0.48 ± 0.9 nM, EE683: 1.37 ± 0.19 nM, EE693: 0.9 nM). L'iodation du D-Tyr en position C-terminale ne change pas l'affinité pour le récepteur, contrairement au cas de l'AVP (JARD et al., 1987). Dans le cas de l'iodation sur la phénylalanine cela semble même l'augmenter. Ce phénomène est contraire à ce qui a été rapporté (BARBEAU, 1991). Les trois radio-ligands semblent posséder de bonnes affinités et de bonnes sélectivités pour être utilisés dans une étude de photomarquage.

3 EXPERIENCE DE PHOTOMARQUAGE:

CARACTERISATION DU RECEPTEUR V_1

Lors de l'étude, deux radio-ligands peptidiques différents ont été utilisés pour photomarquer les protéines membranaires hépatiques de rat Long Evans. Lors de l'utilisation du ^{125}I -EE539, des masses moléculaires de 120, 57.7 ± 7.6 , 42.9 ± 2.1 , et de 32.5 ± 2.5 , et de 14 kDa ont été observées. L'utilisation du ^{125}I -EE683 a permis d'identifier des masses moléculaires de 120, 85, 56.2 ± 5 et de 14 kDa. Les masses

moléculaires de 45 et de 32.5 kDa ont été identifiées comme des formes du récepteur dégradé (BARBEAU et Al., 1991). Les deux masses de ± 56 KDa, qui ont été identifiées comme correspondant à la masse du récepteur V_1 ont confirmé les masses du récepteur V_1 évaluées par les travaux de BARBEAU (1991); soit une masse de 52.8 kDa déterminée par photomarquage à l'aide du ^{125}I -EE539 et une masse de 52.5 ± 3.5 kDa déterminée à l'aide d'un agent réticulant et de l' ^3H -AVP. Les masses moléculaires de 80 kDa et plus observées lors de notre étude doivent leurs origines à l'agglomération des protéines qui survient pendant l'incubation de 5 min. à 99°C . Nous avons poussé l'étude plus loin en utilisant une solution de protéine de référence de masse moléculaire de 158 à 1000 kDa. La migration sur gel de polyacrylamide 3-5% de deux échantillons photomarkués à l'aide du ^{125}I -EE683 en présence ou non d'1 nM d'AVP a permis d'observer un seul pic répétitif à 160 kDa. Cependant l'intensité du signal étant de 25 cpm, on ne peut pas confirmer que c'est un récepteur. Le pic observé dans la région des 80 kDa ne semble pas être un récepteur car on ne le retrouve pas toujours, on pense que c'est le résultat de l'agglomération protéinique, et non pas du photomarquage d'un complexe protéinique fonctionnel.

Cependant, dans la littérature, plusieurs autres masses moléculaires pour le récepteur V_1 ont été déterminées par des expériences de réticulation. FISHMAN (1987) a estimé une masse de 68 kDa pour le récepteur V_1 de foie de rat Sprague Dawley et AIYAR (1991) a démontré une masse de 65 à 68 kDa pour le récepteur V_1 . La différence de masse entre nos résultats et ceux obtenus par réticulation pourrait s'expliquer par le degré

de glycosylation. Au cours de notre étude, des échantillons de membranes de foie de rat Wistar-Kyoto provenant du laboratoire du Dr. Guillemette ont été photomarkés à l'aide de nos radio-ligands; une masse de ± 70 kDa a été déterminée par une séparation sur gel de polyacrylamide 3%-12%. Il semble donc difficile de faire des comparaisons entre les masses des récepteurs V_1 d'une étude à l'autre à moins que les récepteurs soient déglycosylés. La masse du récepteur V_1 a varié, le récepteur V_1 a une masse entre 50.1 et 65.3 kDa. Ces masses correspondent à celles des études ultérieures. A la lumière de ces résultats une étude de la masse des récepteurs devra être faite lorsque déglycosylés, ainsi on pourra mieux comparer les différences de masse moléculaires du récepteur V_1 parmi les diverses espèces animales.

D'autres études par photoaffinité du récepteur V_1 d'AVP ont suggéré qu'il serait un peptide dimérique de 30 et 38 kDa (FARENHOLZ et al., 1986, BOER et al., 1985). Par contre ESTRADA et al. (1991) ont démontré que le récepteur V_1 bovin est un récepteur monomérique. Le clonage des récepteurs V_1 et V_2 a décrit la forme du récepteur comme monomérique à sept domaines transmembranaires possédant 394 A.A. et ayant une masse de 44.0 kDa. Les valeurs de FARENHOLZ et al. (1986); soit des masses de 30 et 38 kDa semblent être des formes du V_1 dégradé plutôt que le récepteur lui-même tout comme les masses de 30 et de 21 kDa qui ont été observées lors de notre étude. Nous pensons que cela correspond à de la dégradation pour deux raisons: la masse observée est inférieure à la masse prédite par le clonage du récepteur, lors d'ajout d'inhibiteur de protéases tel que le leupeptide lors d'études de photomarkage, ces masses ne sont plus retrouvées ou

leur importance est diminuée (information personnelle de G. Guillon).

Une masse moléculaire de 76 ± 8 kDa a été déterminée en inactivant le récepteur V_1 par irradiation. Cette technique donne la masse du complexe protéinique fonctionnel i.e. le récepteur et les protéines G associées (CRAUSE et al., 1984). Si la masse de la protéine Gq de 35 à 43 kDa (WANGE et al., 1991, FITZGERALD et al., 1986) est retranchée de la masse du complexe, une masse de 41 ± 8 kDa est retrouvée. Cette masse, à la limite peut représenter le récepteur V_1 et être une explication à la différence entre nos résultats et ceux cités ci-haut.

Lors du photomarquage à l'aide de nos radio-marqueurs, une masse de 45 kDa a été déterminée. Cette masse correspond à celle des protéines G. Il est peu probable qu'on ait photomarké la protéine G. Cependant, pour répondre à cette question, il aurait été intéressant d'utiliser un anticorps contre la sous-unité β de la protéine G pour définir la nature de cette bande comme a fait le Dr THIBONNIER (1993) ou de photomarker le récepteur V_1 à partir de préparations hépatiques à l'aide d'un radio-marqueur antagoniste après que ces préparations aient subi un traitement pour découpler les protéines-G.

La masse de 45 kDa devrait correspondre aux récepteurs déglycosylés qui selon LOLAIT et al. (1992) a 394 acides aminés et une masse de 44.0 kDa. Plusieurs expériences de déglycosylation ont été effectuées à l'aide de la glycopeptidase F. Plusieurs pics ont été observés entre 200 et 80 kDa, la nature de ces protéines semble

être la même que discuté plus haut. Des masses de 45.0 ± 3.4 et de 43.4 ± 2.7 kDa ont été évaluées à l'aide d'un photomarquage par ^{125}I -EE539 et ^{125}I -EE683 respectivement. Ces masses correspondent à celles déduites par clonage (Lolait et al. 1992) et les résultats de BARBEAU (1992). De plus, le pourcentage (%) de la masse moléculaire représenté par les sucres dans le récepteur entier est de ± 20 % de la masse du récepteur glycosylé. Un pourcentage semblable à celui obtenu par DAM et al. (1987) lors de la déglycosilation du récepteur de la substance P. La masse des sucres (N-glycosylation) entraîne un mince apport à la masse totale du récepteur. De plus les pics généralement retrouvés à 56 kDa ne sont plus observable, cette bande semble donc être le récepteur glycosylé d'AVP.

Les expériences préliminaires de photomarquage des protéines membranaires plaquettaires se sont avérées décevantes à cause du faible signal spécifique obtenu. Malgré la faible différence (75 cpm) entre le profil radioactif de migration des membranes photomarkuées en présence ou en absence d'antagoniste, des masses moléculaires ont été déterminées; une masse de 60 kDa pour le récepteur V_1 chez les membranes non-purifiées et des masses pour les récepteurs V_1 des membranes purifiées de 40.2 ± 4.8 et 43.7 ± 0.9 kDa ont été déterminées à l'aide de ^{125}I -EE539 et ^{125}I -EE683, respectivement. La différence de masse entre le récepteur ayant subi une purification et ceux qui n'ont pas été purifiées pourrait être due à une dégradation lors de la purification additionnelle.

Une autre cause serait une déglycosilation des récepteurs lors de la purification.

Cependant l'intensité du signal est trop faible pour permettre d'envisager une étude plus poussée et significative dans cette voie. On aperçoit ici, la limite de l'application de nos radio-marqueurs dans l'étude du photomarquage. On peut envisager que l'étude de photomarquage des récepteurs V_2 sur des préparations rénales soit aussi difficile à cause du petit nombre de sites de ces préparations membranaires.

L'étude de caractérisation du pic radioactif retrouvé dans plusieurs profils de migration a été un autre point où nos radio-marqueurs ont montré leurs limites d'application. La tache, correspondant à une masse de 160 kDa sur les profils de migration des protéines de la préparation hépatique et plaquettaire, a un signal trop faible (± 25 cpm) pour permettre d'affirmer en toute certitude qu'elle correspond à la masse d'un complexe formé de deux récepteurs d'AVP. Une solution pour obtenir un signal puissant serait l'iodation de nos analogues à l'aide de l'isotope 131 de l'iode. On pourrait alors obtenir une activité spécifique allant jusqu'à 6000 Ci/mmol, cependant le temps de demi-vie de cet isotope est de 12 jours. Une autre solution serait de travailler sur des lignées cellulaires telle que la lignée LLC PK₁ qui exprime beaucoup plus le récepteur V_1 ou V_2 que les préparations membranaires étudiées (JANS et al, 1990).

4. Anticorps sélectif contre le récepteur V_1 ou V_2

Des anticorps dirigés contre les différents récepteurs V_1 et V_2 ont été développés pour obtenir un outil capable de détecter une faible quantité de récepteurs dans un tissu ou une

préparation membranaire. Nous avons choisi 2 séquences de 8 A.A. qui sont uniques au récepteur V_1 et deux autres séquences de 8 A.A. uniques au récepteur V_2 . Une cinquième séquence a été choisie pour être une séquence commune et constante dans l'évolution de tous les types de récepteurs d'AVP et OTR. La synthèse des cinq peptides a été faite en phase solide et des résidus L-lysine tritiée ont été incorporés pour servir de traceurs lors de l'étape du couplage à une protéine porteuse.

Les résultats de l'analyse de l'hydrolyse acide des peptides montrent l'intégrité des séquences. Le rapport relatif entre les A.A déduits de la séquence synthétisée et les ceux observées lors de l'hydrolyse correspondent avec une erreur de $\pm 10\%$. Le contenu en A.A. des peptides semble donc être celui désiré. Pour arriver à cette conclusion, on a assumé que le résidu tryptophane est présent malgré qu'il est indétectable par cette technique parce que son pic d'absorption lors de la chromatographie sort au même endroit que celui des amines et que tous les A.A. ont été introduits dans le bon ordre de la séquence peptidique.

Les anticorps (AC) obtenus ont montré une spécificité et une affinité entre 10 nM et 0.014 nM envers les séquences antigéniques contre lesquelles ils ont été dirigés (résultats non-montrés). Ces anticorps ont de bonnes affinités et semblent pouvoir être utilisés dans plusieurs techniques comme l'immunofluorescence et l'immunodétection sur gel. En général, ces techniques sont utilisables quand les anticorps possèdent des affinités entre 10 nM et 1000 nM (HARLOW et LANE, 1988).

Une étude d'immunodétection sur des préparations de protéines membranaires hépatiques et rénales a permis d'observer une masse moléculaire pour le récepteur V_1 et V_2 . Lorsque l'AC-1 a été incubé en présence des préparations de protéines hépatiques photomarquées, une seule protéine de masse moléculaire de 60 kDa a été observée. Contrairement aux autres anticorps utilisés, la protéine détectée par l'immunodétection avec l'AC-1 ne correspond pas à celle résultant du photomarquage du récepteur. L'AC-1 semble se lier à autre chose que le récepteur V_1 . Pourtant, dans 3 expériences indépendantes sur des membranes hépatiques non-photomarquées, l'AC-1 a permis de détecter des protéines correspondant à des masses de 46 et de 30 kDa (résultats non-illustrés). La liaison du photomarqueur pourrait changer la conformation du récepteur et ainsi défavoriser la liaison de l'anticorps sur celui-ci. Le récepteur non-photomarké semble avoir une conformation qui permet la liaison de l'AC-1 permettant de mettre en évidence des protéines de 46 et de 30 kDa. Ces bandes ne sont pas détectées par les anticorps AC-2 et AC-5 qui reconnaissent une masse de 60 kDa. La correspondance de localisation entre les taches radio-actives et celles développées par immunodétection permet de confirmer la spécificité de nos anticorps pour le récepteur V_1 à l'exception de l'AC-1 qui semble se lier de façon non-spécifique.

La nature de la bande observée à 45 kDa peut être expliquée de deux manières. Premièrement, il est possible que cette bande représente le récepteur déglycosillé, la masse moléculaire prédite par le clonage du récepteur donne une valeur proche de celle-ci soit 44.0 kDa. Le fait de photomarquer le récepteur peut défavoriser la liaison de l'AC-1

sur le récepteur déglycosyllé, ce qui expliquerait l'absence de bande lors de l'immunodétection du récepteur photomarcué. Pour confirmer cette hypothèse qui nous semble la plus probable, nous devrions utiliser cet anticorps sur des membranes de récepteur

ayant subi une déglycosylation au préalable comme nous avons fait avec l'AC-2 et l'AC-4.

La deuxième hypothèse est que la bande représente une forme dégradée du récepteur. Nous avons fait mention plus tôt de la dégradation du récepteur, lorsqu'il y a dégradation, on observe une bande radio-active ayant une masse de ± 45 et 30 kDa. Ces bandes semblent diminuer d'importance lorsque le photomarcage est fait en présence d'inhibiteur de protéase tel que la leupeptine (information personnelle de G. Guillon). L'AC-1 reconnaît une séquence de 9 A.A. du récepteur V_1 (195 à 203). L'AC-5 et l'AC-2 (anticorps sélectif V_1) ont été dirigés respectivement contre les régions 208 à 218 et 324 à 332 de la séquence d'A.A du récepteur V_1 . Si on émet l'hypothèse que le récepteur est coupé entre le site de reconnaissance de l'AC-1 et l'AC-5, ce qui est possible car il y a plusieurs sites accessibles aux endopeptidases, la masse peptidique du fragment obtenue serait entre $19\ 702$ et $20\ 654$ kDa. Comme les sites de glycosylation (2 sites potentiels) se retrouvent sur la séquence N-terminale du récepteur (LOLAIT et al., 1992), la masse du fragment du récepteur contenant le site de liaison de l'AC-1 augmenterait de $\pm 20\ %$ soit de $19\ 000$ kDa. A ce moment, on obtiendrait un fragment de $38\ 702$ à $39\ 654$.

On émet l'hypothèse que le récepteur se dégrade en deux morceaux soit en une protéine de ± 40 kDa et une protéine de ± 20 kDa. On retrouve dans l'étude de photomarquage des protéines hépatiques des pics correspondant à ces masses moléculaires. Les autres anticorps (AC-2 et AC-5) ne peuvent détecter cette protéine correspondant à 40 kDa, Car leurs sites de liaison seraient sur le deuxième fragment du récepteur dégradé i.e. celui de 20 kDa qui en général sort du gel lors de la migration sur SDS-Pages. Malgré que cette hypothèse semble moins pertinente que la première, elle reste une avenue intéressante à explorer. Une expérience que nous pourrions faire pour vérifier cette hypothèse, serait de mettre plusieurs préparations membranaires de foie photomarkées en présence ou non d'inhibiteurs de protéases. Nous pourrions voir si la détection de la tache à 46 kDa par l'anticorps AC-1 est inhibée ou non en fonction des traitements subis par les membranes.

Nous avons observé que l'AC-1 ne reconnaissait pas la protéine de 56 KDa comme les autres anticorps sélectifs V_1 . Cela peut s'expliquer dans le cadre des deux hypothèses par l'inaccessibilité de la séquence antigénique pour l'anticorps lorsque le récepteur est intact ou déglycosillé. La dégradation ou la déglycosylation du récepteur semble permettre à l'anticorps de se lier à l'antigène lorsque celui-ci devient plus accessible. Cependant lorsque le récepteur est préalablement marqué à l'aide de radiomarqueur, l'AC-1 ne semble plus pouvoir se lier aux récepteurs dégradés ou déglycosylés. Cela est peut être dû à l'augmentation de l'encombrement stérique autour du site de l'anticorps. L'AC-1 semblerait se lier au site de liaison ou très près du site de liaison de l'analogue.

Une masse moyenne de 60 kDa a été déterminée pour le récepteur V_1 hépatique. On constate que la bande de 60 kDa détectée par l'AC-2 et l'AC-5 correspond à la bande radio-active de 60 kDa. Les anticorps reconnaissent donc leurs récepteurs respectifs de façon spécifique. Ceux-ci pourront nous aider sûrement à répondre aux questions que nous avons soulevées précédemment.

Nos anticorps ont montré qu'ils pouvaient être déplacés lors d'essai de compétition entre le ligand libre et celui attaché à la paroi d'un puit. Cependant, ces même anticorps n'ont pu être déplacés lors d'essai de compétition entre le ligand libre et le récepteur V_1 sous forme natifs ou dénaturés. Nous supposons que nos peptides ont plus d'avidité sur les récepteurs même que sur les antigènes liés sur les parois. C'est-à-dire que les interactions multivalentes de nos anticorps polyclonaux stabilisent grandement le complexe immun rendant la liaison pratiquement irréversible (HARLOW et LANE, 1988). Une méthode pour atténuer ce problème serait la purification des anticorps selon leur type soit IgM, IgG etc. ou de produire des anticorps monoclonaux. Cependant pour atteindre le but de notre étude, de telles techniques ne sont pas nécessaires mais elle devront être faites ultérieurement.

Les anticorps AC-3 et AC-4 ainsi que l'AC-5 ont permis d'évaluer une masse moléculaire moyenne de 63 kDa pour récepteur V_2 . Il n'y a qu'une bande de 62 kDa; cela nous donne un indice de la spécificité de notre anticorps envers le récepteur V_2 . Dans la littérature, FAHRENHOLZ et al. (1985) ont déterminé une masse de 30 kDa à

l'aide d'un photomarqueur tritié. Le profil de migration obtenu par FAHRENHOLZ (1985) montrent deux pics soit un pic de 67 kDa et un autre de 30 kDa. L'intensité de chaque pic est respectivement de 100 et de 350 cpm. Le pic majoritaire semble être le résultat d'une dégradation du récepteur d'AVP; le récepteur aurait une masse de 67 kDa et après avoir subi un gradient de sucrose et une incubation sans inhibiteur de protéases, sa masse atteindrait alors 30 kDa. Un autre argument contre l'identification de cette masse de 30 kDa est la masse obtenue par le clonage du V_2 de rat soit une masse de 40 518 kDa (LOLAIT et al., 1992). Malgré que nos résultats soient préliminaires, on suppose que la masse du récepteur V_2 glycosylé est de 63 kDa. La spécificité des anticorps pour le récepteur V_2 n'a pas été démontrée à l'aide du photomarquage du récepteur comme dans le cas des anticorps contre le récepteur V_1 à cause du manque de radio-marqueur sélectif.

Nous avons utilisé l'AC-2 et l'AC-5 pour caractériser le récepteur V_1 déglycosylé. Une masse commune de 38 kDa a été déterminée. Cette masse du récepteur déglycosylé se rapproche de la littérature soit 44 kDa (MOREL et al., 1992) et celle déterminée lors de notre étude de photomarquage soit 43.2 kDa. De plus la perte des sucres ne semble donc pas affecter la liaison de l'anticorps sur le récepteur.

Les anticorps sélectifs AC-2, AC-3, AC-4 ainsi que l'AC-5 qui reconnaissent les deux types de récepteurs sont fonctionnels et discriminatifs entre le récepteur V_1 ou V_2 , contrairement aux anticorps monoclonaux dirigés contre un épitope du récepteur d'AVP

(TRINDER et al., 1993) ou les anticorps monoclonaux anti-idiotypiques qui ne sont pas capables de faire une discrimination entre le récepteur V_1 et V_2 (JURZAK et al., 1992). Il semble que nos anticorps aient l'avantage de pouvoir atteindre les sites ciblés; un autre avantage est la connaissance du site de liaison en comparaison aux anticorps monoclonaux (TRINDER et al., 1993). Mais un des avantages est la sélectivité des anticorps pour leurs séquences antigéniques donc pour les récepteurs d'AVP.

Nos anticorps ont été synthétisés à partir des séquences peptidiques déduites à l'aide du clonage du récepteur V_1 et V_2 de rat. L'homologie entre les séquences d'A.A. (195 à 203) du récepteur V_1 de rat, le récepteur V_2 de rat et de porc est respectivement de 12 % et 11 % tandis qu'elle est homologue à 25 % avec le récepteur de l'oxytocine (OTR) de rat et 11 % avec l'oxytocine humaine et porcine. La séquence 324 à 332 du récepteur V_1 de rat n'est pas retrouvée dans les récepteurs V_2 et OTR de rat mais se retrouve à 11 % d'homologie avec le récepteur de l'OTR humain et de porc ainsi que chez le récepteur V_2 humain. La séquence 183 à 191 du récepteur V_2 de rat possède 50 % d'homologie avec la séquence correspondante dans le récepteur V_1 de rat, 30 % avec le récepteur de l'OTR de rat, 44 % avec la séquence du récepteur de l'OTR porcin et humain. La séquence 296 à 305 du récepteur V_2 de rat a 33 % d'homologie envers le récepteur V_1 et de l'OTR de rat, une homologie de 28 % a été constatée avec le récepteur de l'OTR humain et porcin. La séquence 208 à 218 du récepteur V_1 de rat a 100 % d'homologie avec le récepteur V_2 de l'OTR de rat, de l'OTR humain et porcin, le récepteur V_2 humain et porcin possède 81 % d'homologie (BARBERIS et al., 1993, GORBULEV et al. 1993).

Les pourcentages d'homologie des peptides correspondant aux séquences 324 à 332 du récepteur V_1 et 183 à 191, 296 à 305 du récepteur V_2 donnent une indication sur la faible possibilité de réaction croisée des anticorps entre le récepteur V_1 et le récepteur V_2 . Cependant l'homologie entre la séquence 183 à 191 du récepteur V_2 et la séquence correspondante du récepteur V_2 humain et porcin a été évaluée à 100 % et 88 % respectivement. La séquence 296 à 305 du récepteur V_2 possède 78% d'homologie avec le récepteur V_2 humain et porcin. Avec ce pourcentage d'homologie entre les séquences antigéniques du rat et celles correspondantes dans l'humain et le porc, il serait raisonnable de penser que ces anticorps (AC-3, AC-4) vont reconnaître les récepteurs humains ou porcins. Le récepteur V_1 humain n'a pas encore été cloné, nous émettons l'hypothèse que les séquences d'A.A correspondant aux régions reconnues par l'AC-1, l'AC-2 et l'AC-5 devaient avoir une haute homologie.

Nous avons voulu voir si ces anticorps pouvaient réellement lier les récepteurs humains comme le pourcentage d'homologie le prédit. Nous avons utilisé ces anticorps pour caractériser les récepteurs vasopressinergiques sur une lignée cellulaire de l'épithélium du tubule proximal de rein humain immortalisée, les PT₁. Pour cette expérience d'immunofluorescence, nous avons utilisé l'AC-2 et l'AC-4 qui semblent être les plus spécifiques et sélectifs pour chaque type de récepteurs d'AVP. On a utilisé une lignée cellulaire de muscles lisses d'aorte foetal soit les cellules A₇R₅ qui ne possède que les récepteurs V_1 (THIBONNIER et al., 1991). L'AC-2 a démontré qu'il liait une protéine membranaire que nous supposons être le récepteur V_1 tandis que l'AC-4 a

démontré qu'il ne reconnaissait aucune protéine de surface; cette lignée cellulaire ne possédant que le récepteur V_1 , nous ne sommes pas surpris que cet anticorps ne reconnaisse aucune protéine. L'utilisation de ces anticorps sur les PT_1 démontrent que la lignée semble posséder deux types de protéines de surface. Si on tient compte de l'étude de western blot précédante où nous avons démontré que les anticorps sélectif V_1 et V_2 reconnaissent les récepteurs contre lesquels ils sont dirigés, nous pouvons supposer que cette lignée cellulaire possède une population de récepteur V_2 et de récepteur V_1 . L'intensité de la fluorescence n'étant pas quantitative nous ne pouvons pas affirmer que l'une ou l'autre des protéines de surface que nous assumons être V_1 ou V_2 est majoritaire. La preuve pour justifier la nature V_1 ou V_2 des protéines de surface observées serait de faire une étude de compétition avec l'antigène libre. S'il y avait déplacement de l'anticorps par l'antigène libre cela indiquerait que la liaison de l'anticorps est spécifique et sélective aux récepteurs de la vasopressine. Par l'étude d'immunofluorescence on ne peut confirmer si nos anticorps reconnaissent effectivement les récepteurs d'AVP à cause du manque de contrôle. Nous avons donc fait un contrôle en utilisant les préparations membranaires des cellules PT_1 pour des études d'immunodétection. Les protéines détectées par l'utilisation de l'AC-2 sur les protéines membranaires des cellules PT_1 sont différentes de celles détectées par l'utilisation de l'AC-4. Lorsqu'on incube les membranes cellulaire simultanément avec l'AC-2 et l'AC-4, on retrouve l'ensemble des protéines mise en évidence par l'AC-2 et l'AC-4 seul. L'ensemble de ces protéines est retrouvés lors de l'utilisation de l'AC-5 qui reconnait les deux types de récepteurs d'AVP sans discrimination. Ces multiples protéines misent en évidence sur la membrane de

nitrocellulose sont dues à la dégradation des protéines. Dans une expérience préliminaire, nous avons pu observer avec la même préparation, une protéine unique à l'aide de l'AC-2 à 40.5 kDa et une autre à 65 kDa lorsqu'on a utilisé l'AC-4 (résultat non montré).

Ces deux résultats préliminaires i.e. l'immunofluorescence et l'immunoblotting démontrent que nos anticorps peuvent reconnaître des protéines de surface sous une forme native et non seulement sous une forme dénaturée. Nous émettons l'hypothèse que ces mêmes protéines sont les récepteurs d'AVP dans leurs formes natives donc les anticorps peuvent reconnaître le récepteur d'AVP humain. Ces anticorps après certains contrôles pourront donc être utilisés ultérieurement dans des études de caractérisation des récepteurs d'AVP chez des lignées cellulaires ou chez différents tissus.

CONCLUSION

Le but de notre étude était de synthétiser un analogue peptidique photosensible spécifique et sélectif envers le récepteur V_1 ou V_2 , ainsi que de développer des anticorps polyclonaux sélectifs aux différents types de récepteurs de la vasopressine.

Nous avons évalué plusieurs analogues peptidiques, deux d'entre eux se sont montrés intéressants.

Le EE683: [β,β diméthyl- β -mercaptopropionyl¹, p-benzoylphenylalanyl², Val⁴, Lys⁸, D-Tyr⁹]VP s'est avéré être un analogue sélectif pour le récepteur V_1 avec un pKd de 8.7 pour le récepteur V_1 et un pKd de 6.53 pour le récepteur V_2 , le EE683 a un ratio de sélectivité V_1/V_2 de 0.007. L'incorporation d'¹²⁵I sur le résidu D-Tyr en position 9 se fait facilement et ne semble pas affecter le pKd de l'analogue (8.86). Celui-ci est idéal pour l'étude de photomarquage après avoir démontré un haut taux d'étiquetage de 28.5 % dans les membranes. La migration d'un échantillon de protéines hépatiques photomarkuées à l'aide de cet analogue a permis d'identifier des masses de 56.2 KDa pour le récepteur V_1 glycosylé et de 43.4 pour le même type de récepteur ayant subi une déglycosylation.

Le EE693: [β,β -cyclopentaméthylène- β -mercaptopropionyl¹, D-p-benzoylphenylalanyl², nitrophénylalanyl³, Ile⁴, desGly⁹]VP montre un pKd selon CHENG-PRUSOFF (1978) de 8.30 sur le récepteur V_2 et de 6.61 sur le récepteur V_1 . L'iodation de l'analogue améliore son affinité pour le récepteur, son pKd devient de 9.04. Cependant l'iodation du EE693 qui se fait par la méthode de Gatttberman-Sandmeyer i.e en position para du cycle

benzénique de la phénylalanine. L'iodation s'est avéré difficile et le rendement limite son utilisation.

Nous avons développé des anticorps polyclonaux sélectifs aux récepteurs V_1 et V_2 . La plus part reconnaissent leurs antigènes avec de bonnes affinités et spécificités. Nous avons pu les utiliser dans des expériences d'immunodétection. Des masses de ± 60 kDa pour le récepteur V_1 et V_2 glycosylé et une masse de 38 kDa ont été évaluées pour le récepteur V_1 déglycosylé. L'AC-2 et l'AC-4 ont été utilisés pour leurs plus grandes spécificités, ces deux anticorps sont capables de lier les récepteurs dans leur forme native comme dans le cas de la caractérisation des lignées cellulaires du tubule proximal humain. De plus, nos anticorps peuvent se lier aux récepteurs d'AVP humains.

Dans un futur proche, les outils que nous avons développés vont être utiles pour répondre à plusieurs questions comme celles qui ont été soulevées dans la section discussion de ce mémoire.

REMERCIEMENTS

Je désire remercier le Dr Emanuel Escher de m'avoir accepté dans son laboratoire et de m'avoir permis de travailler sur un projet original et stimulant. Je le remercie de ses conseils judicieux et de ses encouragements constants.

Je remercie le Dr. Richard Leduc et le Dr. Gilles Dupuis de m'avoir permis d'utiliser leurs appareillages et d'avoir fait la correction de ce mémoire malgré leur horaire chargé.

Je remercie les gens de mon laboratoire qui m'ont accompagné dans mon cheminement soit Marie-Christine Paré, Chantal Savoie, Stéphane Laporte, Guy Servant, et principalement Roger Bossé, Pierre Dagenais et Marie-Reine Lefebvre.

Un remerciement spécial à François Boudreau, au Dr Claude Asselin et au Dr. Richard Leduc qui ont fait la culture cellulaire utilisée dans notre étude.

et enfin à tous les professeurs et les membres du département de Pharmacologie qui ont participé, de près ou de loin, à mon apprentissage.

BIBLIOGRAPHIE

AIYAR, N., NAMBI, P., CROOKE, S.T., (1991), Solubilisation of vasopressin receptors, *Methods Neurosci*, **5**: 185-191.

ALTURA, B. ET ALTURA, B.T., (1977), Vascular smooth muscle and neurohypophyseal hormones. *Federation Proc.*, **3**: 1853-1860.

AMMAR, A., ROSEAU, S., BUTLEN, D., (1992), Pharmacological characterization of V_{1a} vasopressin receptors in the rat cortical collecting duct, *Am. J. Physiol.*, **262**: F546-F553

BARBEAU, D., (1991), Développement d'analogues photosensibles et fluorescents de la vasopressine et marquage par photoaffinité du récepteur V_1 , *Mémoire de maîtrise*, Université de Sherbrooke, pp.1-103

BARBEAU, D., GUAY, S., NEUGEBAUER, W., ESCHER, E., (1992), Preparation and biological activities of potential vasopressin photoaffinity labels, *J. Med. Chem.*, **35**: 151-157.

BARBERIS, C., SEIBOLD, A., ISHIDO, M., ROSENTHAL, W., BIRNBAUMER, M., (1993), Expression cloning of the human V_2 vasopressin receptor, *Regul peptides*, **45**: 61-66.

- BIRNBAUMER, M., SEIBOLD, A., GILBERT, S., ISHIDO, M., BARBERIS, C.,
ANTARAMIAN, A., BRABET, P., ROSENTHAL, W., (1992), Molecular cloning of
the receptor for human antidiuretic hormone, *Nature*, **357**: 333-335.
- BLAKE, J., LI, C.H., (1975), The synthesis and biological activity of (165, 182, 189-S-
carbamidomethylcysteine)-human growth hormone - (140-191), *Int. J. Peptide Prot.*
Res., **7**: 495-501
- BOER, R., FAHRENHOLZ, F., (1985), Photoaffinity labeling of the V₁ vasopressin
receptor in plasma membranes from rat liver, *J. Biol. Chem.*, **260**: 15051-15054.
- BOSSE, R., NEUGEBAUER, W., ESCHER, E., (1989), Peptide iodination on
phenylalanine residues. In: *Synthesis and application of isotopically labelled
compound*, T.A. Ballie & J.R. Jones (Eds), Amsterdam, The Netherlands, p.761-766.
- BOYD, N.D., WHITE, C.F., CERPA, R., KAISER, E.T., LEEMAN, S.E., Photoaffinity
labeling the substance P receptor using a derivative of substance P containing p-
benzoylphenylalanine, *Biochemistry*, **30**:336-342.
- CARPINO, L.A., GIZA, AND CARPINO, B.A. (1959), O-Acylhydroxylamines. I. Synthesis
of O-benzoylhydroxylamine, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**: 955-957.

- CARTER, J.S., WILLIAMS, W.J., DAVIS, W.J., FRENCH, K.E.,(1991), Effects of DDAVP on movement planning and execution processes in the healthy elderly, *Peptides*, **12**: 871-876.
- CHENG, Y., PRUSOFF, W.,M., (1978), Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 % inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem. pharmacol.*, **22**: 3099-3108.
- CORDOPATIS, P., THEODUROPOULOS, D., GUILLEMETTE, G., ESCHER, E., (1981), Studies on position 1 of angiotensin II: effect on affinity and duration of action from alkyl amide substitution, *J. Med. Chem.*, **24**: 209-211.
- COWLEY, A.W., CUSHMAN, W.C., QUILLEN, C.W., SKELTON, M.M., LANGFORD, H.S., (1981), Vasopressin elevation in essential hypertension and increased responsiveness to sodium intake. *Hypertension*, **3**: 193-200.
- CRAUSE, P., BOER, R., FAHRENHOLZ, F., (1984), Determination of the functional size of vasopressin isoreceptors, *FEBS letters*, **175**: 383-386.
- CRAUSE, P.,FAHRENHOLZ, F., (1982), Affinities of reactive vasopressin analogues for bovine antidiuretic receptor, *Mol. Cell Endocrinol.*, **28**: 529-541.

CRUZ, L.J., SANTOS, V., ZAFARALLA, G.C., RAMILO, C.A., ZEIKUS, R., GRAY, W.G., OLIVERA, B.M., (1989), Invertebrate vasopressin/oxytocin homologs, *J. Biol. Chem.*, **262**: 15821-15824.

DAGENAIS, P., ESCHER, E., (1992), Anti-angiotensin antibodies cross-reactive with nonpeptide angiotensin antagonist as angiotensin receptor model, *Regul peptides*, **44**: 239-247.

DAM, T.V., ESCHER, E., QUIRION, R., (1987), Apparent molecular weight of substance P/neurokinin-1 receptors determined using a photoaffinity labelled probe, (13'-¹²⁵I)D-Tyr⁰, (4'-N₃Phe⁸), Nle¹¹)-substance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **149**: 297-303.

DE WULF, H., KEPPENS, S., VANDENHEEGE, J.R., HAUSTRACTE, F., PROOST, C., CARTON, H., (1980), Cyclic AMP independent regulation of liver glycogenolysis. J. Nunez et J. Dumont (Eds): *Human and cell regulation*. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, New York, Oxford, p.22-57.

DU VIGNEAUD, V., (1956), The isolation and proof of structure of the vasopressin and the synthesis of octapeptide amines with pressor-antidiuritic activity, *Proc. 3rd Int. Congress on Biochemistry*, Brussels, seq. Academic press, New York, p. 41.

ESCHER E., (1984), A new method for iodine labelling of peptid hormone, J. Receptor Res., 4: 331-336

ESTRADA, E.F., BARRA, V., CAORSI, C.E., TRONCOSO, S., RUIZ-OPAZO, N., GONZÈLEZ, C.B., (1991), Identification of the V_1 vasopressin receptor by chemical cross-linking and ligand affinity blotting, Biochemistry, 30: 8611-8616.

FAHRENHOLZ, F., BOER, R., CRAUSE, P., TOTH, V., (1985), Photoaffinity labelling of renal V_2 vasopressin receptor. Identification and enrichment of a vasopressin-binding subunit, Eur. J. Biochem., 152: 589-595.

FAHRENHOLZ, F., KORJO, E., MULLER, M., BOER, R., LOHR, R., ET GRONKA, Z., (1986), Iodinated photoreactive vasopressin antagonists: labelling of hepatic vasopressin receptor subunits, Eur. J. Biochem., 161: 321-328

FISHMAN, J.B., DICKEY. B.F., FINE. R.E., (1987), Purification and characterization of the rat liver vasopressin (V_1) receptor, J. Biol. Chem., 262: 14049-14055

FITZGERALD. T.J., UHING. R.J., EXTON. J.H., (1986), Solubilization of the vasopressin receptor from rat liver plasma membranes, J. Biol. Chem., 261: 16871-16877

GAINER, H., WRAY, S., (1992), Oxytocin and Vasopressin from genes to peptides, Anal N.Y. Acad. of Science, **652**: 14-28

GALLO-PAYET, N., DEZIEL, Y., LEHOUX, J.G., (1984) Vasopressin: A potent growth factor in adrenal glomerulosa cells in culture, J. Steroid Biochem., **20**: 449-454.

GORBULEV, V., BUCHNER, H., AKHUNDOVA, A., FAHRENHOLZ, F., (1993), Molecular cloning and functional characterization of V2 [8-lysine] vasopressin and oxytocin receptors from a pig kidney cell line, Eur. J. Biochem., **215**: 1-7

GRAS-MASSE, H., AMEISEN, J.C., BOUTILLON, F.R., BOSSUS, M., DEPREZ, B., CAPRON, A., TARTAR, A., (1991) Synthetic vaccines: The mixotope strategy, Peptide, **12**: 842-844.

GRIFFIN, J.E., OJEDA, S.R., (1992), Textbook of endocrine physiology, Oxford University Press, New York, 1992, p.80-135

GRIGORIADIS, D.E., NIZNIK, H.B., JARVIE, K.R., SEEMAN, P., (1988), Glycoprotein nature of D₂ dopamine receptors, FEBS letters, **227**: 220-224.

GUILLEMETTE, G., (1982) Le récepteur de l'angiotensine II: marquage par photoaffinité, isolation et caractérisation, Thèse de doctorat, Université de Sherbrooke.

GUILLON, G., (1989), Les récepteurs à la vasopressine, l'oxytocine et l'angiotensine chez les mammifères, *Ann. Endocrinol.*, **50**: 425-433.

GUILLON, G., BALESTRE, M.N., CHOUINARD, L., GALLO-PAYET, N., (1990), Involvement of distinct G-proteins in the action of vasopressin on rat glomerulosa cells, *Endocrinology*, **126**: 1699-1708.

HARLOW, E., LANE, D., (1988), *Antibodies, A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor laboratory, New york, p.28,33,294.

HAZUN, E., (1983), Photoaffinity labelling of peptide hormone receptors. *Endocrine Rev*, **4**: 352-362.

HOLMGREN, K., Magnusson, K.E, Franki, N., Hays, R.M., (1992), ADH-induced depolymerization of F-actin in the toad bladder granular cell: a confocal microscope study, *Am. J. Physiol.*, **262**: C672-C677.

ITOH, N., YONEHARA, S., SCHREURS, J., GORMAN, D.M., MARUYAMA, K., ISHII, A., YAHARA, I., ARAI, K.I., MIYAJIMA, A., (1990), Cloning of an interleukin-3 receptor gene: A member of a distinct receptor gene family, *Science*, **247**: 324-326.

- JANS, D.A., BERGMAN, L., PETERS, R., FAHRENHOLZ, F., (1990), Biotinyl analogues of vasopressin receptor expression in cultured cells, *J. Biol. Chem.*, **265**, 14599-14605.
- JARD, S., (1988), Mechanisms of action of vasopressin and vasopressins antagonists, *Kidney international*, suppl. **26**: S38-42.
- JARD, S., GAILLARD, R.C., GUILLON, G., MARIE, J., SCHOENENBERG, P., MULLER, A.F., MANNING, M., SAWYER, W.H., (1986), Vasopressin antagonists allow demonstration of a novel type of vasopressin receptor in the rat adenohypophysis, *Mol. Pharmacol.*, **30**: 171-177.
- JARD, S., JAMISON, R., (1991), Vasopressin, Les éditions INSERM, Paris, p. 297-309.
- JARD, S., LOMBARD. C., SEYER, R., AUMELAS. A., MANNING, M., SAWER, W.H., (1987), Iodination of vasopressin analogues with agonistic and antagonistic properties: Effects on biological properties and affinity for vascular and renal vasopressin receptors, *Mol. Pharmacol.*, **32**: 369-375.
- JENKINS, J.S., (1991), Thirst and vasopressin, *Clin. Endocrinol.*, **35**: 219-220.
- JUNG, K.Y., ENDOU, H., (1991), A novel vasopressin receptor in rat early proximal tubule, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, **180**: 131-137.

- JURZAK, M., JANS, D.A., HAASE, W., PETERS, R., FAHRENHOLZ, F., (1992),
Generation of anti-idiotypic monoclonal antibodies recognizing vasopressin receptors in
cultured cells and kidney sections, *Exp. Cell Res.*, **203**: 182-191
- KAISE, E., COLESCOTT, R.L., BOSSINGER, C.D., AND COOK, P.I., (1970), Color test
for detection of free terminal amino groups in the solid-phase synthesis of peptides,
Anal Biochem., **34**: 595-598.
- KIM, J.k., SOUBRIER, F., MICHEL, J.B., BANKIR, L., CORVOL, P., SCHRIER, R.W.,
(1990), Arginine vasopressin gene regulation in the homozygous Brattleboro rat, *J.*
Clin. Invest., **86**: 14-16
- KIMURA, T., TANIZAWA, O., MORI, K., BROWNSTEIN, M.J., OKAYAMA, H.,
(1992), Structure and expression of a human oxytocin receptor, *Nature*, **356**: 526-
529.
- KINTER, L.B., MCCONNELL, I., GOODWIN, B.T., CAMPBELL, S., HUFFMAN,
W.F., ARTHUS, M.F., LONERGAN, M., BICHET, D.G., (1992), Vasopressin
antagonist inhibition of clotting factor release in the rhesus monkey (*Macaca mulatta*),
J. Pharmacol. Exp. Ther., **261**: 462-468.

KRUSZYNSKI, M., LAMMEK, B., MANNING, M., SETO, J., HALDAR, J., SAWYER, W.H., (1980), [1-(β -mercato- β - β -cyclopentamethylene propionic acid), 2-(O-methyl) tyrosine] argine vasopressin and [1-(β -mercapto- β - β -cyclopentamethylene propionic acid)] arginine vasopressin, two highly potent antagonists of the vasopressor response to arginine-vasopressin, *J. Med. Chem.*, **23**: 364-368.

LAEMMLI, V.K., (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680.

LOLAIT, S., O'CARROLL, A.M., McBRIDE, O.W., KONIG, M., MOREL, A., BROWNSTEIN, M.J., (1992), Cloning and characterization of a vasopressin V_2 receptor and possible link to nephrogenic diabetes insipidus, *Nature*, **357**: 336-339.

LOUP, F., TRIBOLLET, E., DUBOIS-DAUPHIN, M., DREIFUSS, J.J., (1991), Localisation of high-affinity binding sites for oxytocin and vasopressin in the human brain. An autoradiographic study, *Brain Res.*, **555**: 220-232.

LOWRY, O.H.R., FARR, N.J., RANDALL, R.J., (1951), Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.

MANNING, M., OLMA, A., KLIS, A.W., KOŁODZIEJEZYK, A.M., NAWROCKA, E., MISICKA-KESIK, A., SETO, J., SAWYER, W.H., (1984), Carboxy terminus of vasopressin required for activity but not binding. *Nature*, **308**: 652.

MANNING, M., SAWYER, H.W., (1991), Antagonists of vasopressin and oxytocin: current status and future perspectives, *Vasopressin*. Ed. S. Jard, R. Jamison. Colloque INSERM/John Libbey Eurotext Ltd, **208**: 297-309.

MASU, Y., NAKAYAMA, K., TAMAKI, H., HARADA, Y., KUNO, M., NAKANISHI, S., (1987), cDNA cloning of bovine substance-K receptor through oocyte expression system, *Nature*, **329**: 836-838.

MERRIFIELD, R.B., (1963), Solid-phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide, *J. Am. Chem. Soc.*, **85**: 2149-2154

MICHELL, R.H., KIRK, J.C., BILLAH, M.M., (1979), Hormonal stimulation of phosphatidylinositol breakdown, with particular reference to the hepatic effect of vasopressin, *Biochem. Soc. Trans.*, **7** : 861-865

MOREL, A., O'CARROLL, A.M., BROWNSTEIN, M.J., LOLAIT, S.J., (1992), Molecular cloning and expression of a rat V_{1a} arginine vasopressin receptor, *Nature*, **356**: 523-525

- MURPHY, T.J., ALEXANDER, R.W., GRIENDLING, K.K., RUNGE, M.S.,
BERNSTEIN, K.E., (1991), Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1
angiotensin II receptor, *Nature*, **351**: 233-236.
- NAGAYAMA, Y., KAUFMAN, K.D., SETO, P., RAPOPORT, B., (1989), Molecular
cloning, sequence and functional expression of the cDNA for the human thyrotropin
receptor, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **165**: 1184-1190.
- NEVILLE, DAVID, M., (1968), Isolation of an organ protein antigen from cell- surface
membrane of rat liver, *Biochem. Biophys. Acta*, **154**: 540-552.
- OSTROWSKI, N.L., LOLAIT, S.J., BRADLEY, D.J., O'CARROL A.M.,
BROWNSTEIN. M.J., YOUNG. W.S., (1992), Distribution of V_{1a} and V₂ vasopressin
receptor messenger ribonucleic acids in rat liver, kidney, pituitary and brain,
Endocrinology, **131**: 533-535.
- PARMENTIER, M., LIBERT, F., MAENHAUT, C., LEFORT, A., GERARD, C.,
PERRET, J., VAN SANDE, J., DUMONT, J.E. VASSART, G., (1989), Molecular
cloning of thyrotropin receptor, *Science*, **246**: 1620-1622.

PAYET, N., LEHOUX, J.G., (1982), Aldosterone and corticosterone stimulation by ACTH in isolated rat adrenal glomerulosa cells: Interaction with vasopressin, *J. Physiol.*, **78**: 317-321.

RAJERISON, R., MARCHETTI, J., ROY, C., BOCKAERT, J., JARD, S., (1974) The vasopressin sensitive adenylate cyclase of the rat kidney, *J. Biol. Chem.*, **249**: 6390-6400.

SAWYER, W.H., MANNING, M., (1988), The development of potent and specific vasopressin antagonist, *Kidney Int*, **34**, suppl. 26: S34-S37.

SAWYER, W.H., MANNING, M., BUTLEN, D., GUILLON, G., RAJERISON, R.M., JARD, S., (1978), Stuctural requirements for activation of vasopressin-sensitive adenylate cyclase, hormone binding, and antidiuretic actions: effects of highly potent analogues and competitive inhibitors, *Mol. Pharmacol.*, **14**: 1006-1017.

SCATCHARD, G., (1949), The attraction of proteins for smalls molecules and ions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **51**: 660-672.

SEEVERS, R.G., COUNSELL, R.E., (1982), Radioiodination technique for small organic molecules, *Chem. Rev.*, **82**: 575-590.

- SETTY, B.N.Y., DAMPIER, C.D., STUART, M.J., (1992), 1-Deamino-8 D-arginine vasopressin decreases the production of 13-hydroxyoctadecadienoic acid by endothelial cells, *Thromb. Res.*, **67**: 545-558.
- SIMON, J.S., BRODY, M.J., KASSON, B.G., (1992), Characterization of a vasopressin-like peptide in rat and bovine blood vessels, *Am. J. Physiol.*, **31**: H799-H805.
- STEWART, J.M., YOUNG, J.D., (1983), Solid phase peptide synthesis, Pierce Chemical Compagny, Rockford, IL, p. 1-41
- SUEHIRO, M., YIKOI, F., IWAMOTO, M., (1987), No-carrier-added radiobromination via the Gatterman reaction. Synthesis of ⁷⁵BR- and ⁷⁷BR- bromperidol., *J Label Compound Radiopharm.*, **24** (10): 1143-1157.
- TAHRI-JOUTEI, A., FILLION, C., BEDIN, M., HUGUES, J.N., POINTIS, G., (1991), Local control of Leydig cell arginine vasopressin receptor by naloxone, *Mol. Cell Endocrinol.*, **79**: R21-R24.
- THIBONNIER, M., (1987), Vasopressin: the antidiuretic hormone, *La Presse Médicale* (Paris), **16**: 481-485.

THIBONNIER, M., (1988), Use of vasopressin antagonist in human diseases, *Kidney Int*, **34**, Suppl. 26: S48-S51.

THIBONNIER, M., (1990), Vasopressin agonists and antagonists, *Horm. Res.*, **34**: 124-128.

THIBONNIER, M., BAYER, A.L., SIMONSON, M.S., KESTER, M., (1991), Multiple signaling pathways of V_1 -vascular vasopressin receptors of A7R5 cells, *Endocrinology*, **129**: 2845-2856.

THIBONNIER, M., BAYER, A.L., SIMONSON, M.S., SNAJDAR, R.M., (1990), Reconstitution of solubilized V_1 vasopressin recepteur of human platelets, *Am. J. Physiol.*, **259**: E751-E756.

THIBONNIER, M., TAUQIR, G., BERTI-MATTERA, L., (1993), G-protein coupling of human platelet V_1 vascular vasopressin receptors, *Am. J. Physiol.*, **264**: C1336-C1344

TRINDER, D., MOOSER, V., PHILLIPS, P.A., SMITH, A.I., CASLEY, D., JOHNSTON, C.I., (1993), monoclonal antibodies to arginine vasopressin receptor bind to liver, kidney and pituitary membranes, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **20**: 443-449

VAN KESTEREN, R.E., SMIT, A.B., DIRKS, R.,W., WITH, N.D., GERAERTS, W.P., JOOSSE, J., (1992), Evolution of the vasopressin/oxytocin superfamily: Characterization of a cDNA encoding a vasopressin-related precursor, preproconopressin, from the mollusc *Lymnaea Stagnalis*, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, **89**: 4593-4597

VON ARX, E., FAUPEL, M., BRUGGER, M., (1975) Das 4,4-Tetramethyldiamino-diphenylmethan Reagens (TDM), Eine Modifikation der Chlor-o-Tolidin Farbereaktion für die Dünnschicht-chromatographie, J. Chromatogr., **120**: 224-228

WANGE. R.L., SMRCKA. A.V., STERNWEIS. P.C., EXTON. J.H., (1991), Photoaffinity labeling of two rat liver plasma membrane proteins with [³²P] gamma-azidoanilido GTP in response to vasopressin, J. Biol. Chem., **266**: 11409-11412.

WIELAND, T., FLUOR, F., BIRR, C., (1973), Peptide synthesis. Preparation of symmetric anhydres of several (tert-butoxy-carbonyl) amino acids. J. Liebigs. Ann. Chem., **10**: 1595-1598

WEBER, K. et OSBORN, M., (1969), The reliability of molecular weight determined by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, J. Biol. Chem. **244**: 4406-4412.

- WEINGARTNER, H., BALLENGER, P.G.J., SMALLBERG, S.A., SUMMERS, R., RUBINOW, D.R., POST, R.M., GOODWIN, R., (1981) Effect of vasopressin on human memory function, *Science*, **211**: 601-603.
- YAMADA, Y., POST, S.R., WANG, K., TAGER, H.S., BELL, G.I. SEINO, S., (1992), Cloning and functional characterization of a family of human and mouse somatostatin receptors expressed in brain, gastrointestinal tract, and kidney, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **89**: 251-255.
- YANAGISAWA, M., MASAKI, T., (1989), Endothelin, a novel endothelium-derived control, *Biochem. Pharmacol.*, **38**: 1877-1883
- YOKOTA, Y., SASAI, Y., TANAKA, K., FUJIWARA, T., TSUCHIDA, K., SHIGEMOTO, R., KAKIZULA, A., OHKUBO, H., NAKANISHI, S., (1989), Molecular characterisation of a functional cDNA for rat substance P receptor, *J. Biol. Chem.*, **264**: 17649-17652.